

**LÍDIA DOS SANTOS MIRAGAIA**

**INTERAÇÃO DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA DE *LEPTOSPIRA*  
COM VITRONECTINA HUMANA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo  
2016

**LÍDIA DOS SANTOS MIRAGAIA**

**INTERAÇÃO DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA DE *LEPTOSPIRA*  
COM VITRONECTINA HUMANA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientadora: Dra. Angela Silva Barbosa

Versão Original

São Paulo  
2016

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do  
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução parcial

Miragaia, Lídia dos Santos.

Interação de proteínas de membrana de *Leptospira* com vitronectina humana / Lídia dos Santos Miragaia. -- São Paulo, 2016.

Orientador: Angela Silva Barbosa.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Evasão imune de *Leptospiras*.

Versão do título para o inglês: Interaction of surface proteins from *Leptospira* with human vitronectin.

1. Leptospirose 2. *Leptospira* 3. Sistema complemento 4. Vitronectina 5. Evasão imune I. Barbosa, Angela Silva II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB0100/2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): Lídia dos Santos Miragaia.

Título da Dissertação: Interação de proteínas de membrana de *Leptospira* com vitronectina humana.

Orientador(a): Angela Silva Barbosa.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

**Aprovado(a)**

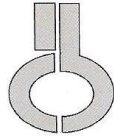
**Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

## CERTIFICADO COMITÊ DE ÉTICA



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"  
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil  
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405  
e-mail: [cep@icb.usp.br](mailto:cep@icb.usp.br)

*Comissão de Ética em Pesquisa*

## CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° **632/13** referente ao projeto intitulado: “*Interação de proteínas de membrana de leptospira com vitronectina humana*” sob a responsabilidade de **Lídia dos Santos Miragaia**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP n°466 de 2012.

São Paulo, 16 de dezembro de 2013.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA  
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A ZANOTTO  
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

## **AGRADECIMENTOS**

*Aos meus pais, Simone e Marcos, por tudo o que já fizeram e fazem por mim. Pela educação, exemplos, valores e amor incondicional. Por sempre acreditarem em mim e nesse meu sonho, por me mostrarem o caminho certo, e por toda a compreensão e ajuda durante esse tempo. Se algum dia eu me tornar metade dos pais que vocês são, tenho certeza que eu colocarei pessoas de bem nesse mundo. Eu, o Whisky, a Panqueca, a Polenta, o Jojo, a Georgina, a Milla e tantos outros bichinhos que já se foram, tivemos e temos muita sorte em ter vocês cuidando de nós. Amo vocês! S2*

*Ao meu amor e melhor amigo, José, obrigada por sonhar comigo! Obrigada por todo apoio, força, coragem e inspiração. Seu apoio foi fundamental para a conclusão desse mestrado e para os novos rumos que vou seguir. Obrigada por tudo meu amor! Eu te amo há dez anos, hoje, amanhã e para sempre! S2*

*À minha orientadora, Angela, por ter acolhido aquela menininha boba em seu laboratório em 2011, e ajudado para o crescimento dela. Obrigada pela confiança, pela força, pelos ensinamentos, pela paciência, por todos os conselhos, por acreditar nas suas alunas e entender o perfil de cada uma e claro, pelos sutis "puxões de orelha" nos momentos certos. Você é um exemplo de pesquisadora dedicada, de orientadora, de mãe, de ser humano e de amiga! Você é realmente o "Angel" que apareceu na minha vida e eu te admiro muito! Só tenho a te dizer: "obrigada, obrigada e obrigada!!!!".*

*À minha eterna companheira de bancada, Ludy, porque todo "Angel" tem o seu braço direito (the little angel) e ninguém faria esse papel melhor do que você. "Oi, você gosta de imuno?". Eu gosto de tudo que a gente construiu juntas em todos esses anos. De experimentos a papers, de congressos a viagens, de prêmios a corridas, de bancada a amizade. Deixar alguém sentar na minha cadeira, usar a minha bancada e aos nossas pipetas (especialmente a minha P100 hahaha) ao seu lado vai ser muito difícil mas eu sei que daqui a pouco estamos juntas de novo. Obrigada minha amiga!*

*As minhas amigas e companheiras do "Lab. 9". Em especial aquelas que me acompanham desde a iniciação científica: Denize, Ligia, Demétria, Tati Gotti, Matilde, Larissa, obrigada por todos os ensinamentos, pelas inúmeras ajudas, pelas risadas e momentos que claramente contribuíram para a pessoa que eu sou hoje.*

*Luiz (Luizinho), deixo agora o meu cargo de mascote do Lab. 9 pra você! Sei que você vai cuidar bem dele e continuar alegrando nosso spacinho.*

*Ps.: alguém terá que montar o Natal no meu lugar!*

*À turma da cobertura e agregados (ou turma do Pirata hahaha), Afonso, Cláudia, Fernanda, Kamila, Roberto, Fernando, Camila Souza, Camila Bueno, Dani Courrol, Shiga, Bruno, Jéssica, Dani Luz, Ju Higa, Thata e Bruna por toda ajuda, explicações e ensinamentos. Ahh e claro, um brinde as nossas sextas-feiras, aos cafés da tarde e aos bons momentos de risadas.*

*À Prof<sup>a</sup>. Lourdes Isaac por me receber diversas vezes em seu laboratório e a todos os seus alunos Monica, Adriana, Leandro, Thaís, Denise, Priscilla, Julia, Jéssica (ok, eu sei que você é aluna da Tati hahaha) e Anielle.*

*À Tatiana Fraga, por toda a ajuda, conselhos e boas conversas principalmente nessa etapa final do mestrado. Sinto que ganhei uma grande amiga! Graças a você essa dissertação foi concluída!*

*Ao meu brother carioca, Jonas, por boas risadas e muitos ensinamentos nos diversos experimentos.*

*A todos os pesquisadores, funcionários e alunos do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan, obrigada por toda ajuda e por todos esses anos de convivência.*

*À FAPESP pelo apoio financeiro durante esses anos.*

*“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”*

*José de Alencar*



## RESUMO

MIRAGAIA, L. S. **Interação de proteínas de membrana de *Leptospira* com vitronectina humana.** 2016. 68 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

A leptospirose, zoonose causada por bactérias patogênicas do gênero *Leptospira*, representa um grave problema de saúde pública nos países tropicais subdesenvolvidos. Os roedores são o principal reservatório urbano da doença. As bactérias entram no hospedeiro por abrasões na pele ou por membranas mucosas e rapidamente se espalham pelo organismo atingindo vários órgãos. A eficiência na colonização apresentada por estes patógenos explica-se pela habilidade que possuem em escapar aos mecanismos de defesa inata do hospedeiro, dentre eles o sistema complemento. Este sistema, composto por mais de 30 proteínas, é a primeira linha de defesa do hospedeiro e pode ser ativado pela via clássica, dependente de complexos antígeno-anticorpo, pela via das lectinas, por açúcares presentes na superfície do patógeno, e pela via alternativa, ativada de maneira espontânea. As três vias culminam para a via terminal, comum a todas, levando à formação do complexo de ataque à membrana (MAC) e lise do patógeno. Como os demais microorganismos patogênicos, leptospirosas possuem estratégias para driblar a ação do complemento ao interagir com os reguladores negativos da via alternativa (Fator H), das vias clássica e das lectinas (*C4bBinding Protein*) e também com o regulador da via terminal (vitronectina). Neste projeto, avaliou-se a interação de vitronectina com três proteínas de membrana de *Leptospira*: LigA, LigB e LcpA. Dados de *Far-Western blot* indicam que as três proteínas interagem com vitronectina por suas porções C-terminais. No que diz respeito à vitronectina, as interações envolvem seus domínios de interação com heparina (HBD1-3). Forças iônicas parecem desempenhar um papel nessas interações. Como diversas bactérias que se ligam à vitronectina também são capazes de se ligar a C9, principal proteína do MAC, avaliou-se também se LcpA, LigA e LigB interagiriam com este componente da via terminal. As três proteínas não só se ligaram a C9 como também impediram a formação do poro *in vitro*, resultante da polimerização de 12 -16 monômeros de C9. A capacidade dessas proteínas de inibir a formação do MAC também foi avaliada utilizando os componentes purificados da via terminal do complemento em um ensaio clássico de hemólise. Tanto a proteína LcpA, quanto as proteínas LigA e LigB inibiram significativamente a lise dos eritrócitos de modo dose-dependente. Como essas proteínas de *Leptospira* interagem com múltiplos reguladores do sistema complemento, avaliou-se se esses componentes iriam partilhar regiões sobrepostas e competir pela ligação nas proteínas. Os ensaios de competição envolvendo FH, C4BP e vitronectina demonstram claramente que estes reguladores interagem simultaneamente com as proteínas através de sítios distintos. A caracterização funcional dessas proteínas, consideradas bons candidatos vacinais, e a descoberta de novos mecanismos utilizados por esse patógeno para sobreviver no hospedeiro podem auxiliar nossa compreensão no que diz respeito a aspectos relacionados à clínica e à prevenção da leptospirose.

**Palavras-chave:** Leptospirose. *Leptospira*. Sistema complemento. Vitronectina. Evasão Imune.

## ABSTRACT

MIRAGAIA, L. S. **Interaction of surface proteins from *Leptospira* with human vitronectin.** 2016. 68 p. Master thesis (Microbiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Leptospirosis, a zoonosis caused by pathogenic bacteria of the genus *Leptospira*, is a serious public health problem in developing tropical countries. Rodents are the main urban reservoir of the disease. *Leptospira* enter the host through abrasions in the skin or mucous membranes and quickly spread throughout the body affecting various organs. The efficiency of colonization by these pathogens can be explained by their ability to escape the innate immune defense mechanisms of the host, including the complement system (CS). The CS comprises more than 30 proteins and is the first line of host defense against invading microorganisms. It can be activated by the classical pathway, dependent on antigen-antibody complexes, through the lectin pathway by sugars on the surface of the pathogen, and by the alternative pathway, spontaneously activated. These three pathways culminate to the terminal pathway, common to all, leading to the formation of the membrane attack complex (MAC) and lysis of the pathogen. Like other pathogenic microorganisms, leptospires employ strategies to evade complement attack by interacting with negative regulators of the alternative pathway (Factor H), of the classical and lectins pathways (C4b Binding Protein) and of the terminal pathway (vitronectin). In this project, we evaluated the interaction of vitronectin with three *Leptospira* membrane proteins: LigA, LigB and LcpA. Far-Western blot analyses indicate that these three proteins interact with vitronectin by their C-terminal portions. With regard to vitronectin, interactions involve its heparin binding domains (HBD1-3). Ionic forces seem to play a role in these interactions. As several bacteria that interact with vitronectin have also been shown to bind C9, the main MAC component, we also evaluated if LigA, LigB and LcpA would interact with this protein. All three proteins not only bound to C9 but also prevented pore formation, which results from the polymerization of 12-16 C9 monomers. The ability of these proteins to inhibit MAC formation was evaluated using purified components of the terminal pathway in a classical hemolysis assay. LcpA and both LigA and LigB inhibited the lysis of red blood cells in a dose-dependent manner. As these proteins from *Leptospira* interact with multiple regulators of the complement system, we evaluated if these components would share overlapping regions and compete for binding to the proteins. Competition assays involving FH, C4BP and vitronectin clearly demonstrate that all three proteins interact with these regulatory proteins through distinct sites. The functional characterization of these proteins, which are considered good vaccine candidates, and the discovery of new mechanisms used by this pathogen to survive in the host may help our understanding of clinical aspects and prevention of leptospirosis.

**Keywords:** Leptospirosis. *Leptospira*. Complement System. Vitronectin. Immune Evasion.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Número de casos confirmados e óbitos por leptospirose no Brasil de 2010 a 2014.....	17
<b>Figura 2</b> - O ciclo de transmissão da leptospirose.....	18
<b>Figura 3</b> - Natureza bifásica da leptospirose e aspectos relevantes em diferentes estágios da doença.....	19
<b>Figura 4</b> - Sinais e sintomas dos casos confirmados de leptospirose.....	20
<b>Figura 5</b> - Microscopia eletrônica de varredura de <i>Leptospira</i> .....	22
<b>Figura 6</b> - Representação esquemática da membrana de <i>Leptospira</i> .....	23
<b>Figura 7</b> - Espécies de <i>Leptospira</i> determinadas segundo a classificação genotípica.....	24
<b>Figura 8</b> - Três vias de ativação do sistema complemento: alternativa, clássica e das lectinas.....	29
<b>Figura 9</b> - Inibição da ativação da via alternativa por FH.....	31
<b>Figura 10</b> - Inibição da ativação da via clássica ou das lectinas por C4BP.....	32
<b>Figura 11</b> - Funções regulatórias da vitronectina.....	33
<b>Figura 12</b> - Modelo esquemático dos domínios presentes na molécula de vitronectina.....	34
<b>Figura 13</b> - Ligação da vitronectina humana a diferentes espécies de <i>Leptospira</i> .....	35
<b>Figura 14</b> - Modelo esquemático das proteínas recombinantes Lig (LigAC, LigBC e LigBN).....	37
<b>Figura 15</b> - SDS-PAGE das proteínas recombinantes purificadas.....	47
<b>Figura 16</b> - Mapeamento dos domínios de interação das proteínas Lig e LcpA.	48
<b>Figura 17</b> - Interação de LcpA, LigAC e LigBC com vitronectina na presença de heparina ou de PAI-1.....	49
<b>Figura 18</b> - Avaliação do papel das forças iônicas na interação de LcpA, LigAC e LigBC com vitronectina.....	50
<b>Figura 19</b> - Interação de proteínas com o componente C9.....	51

<b>Figura 20</b> - Inibição da polimerização de C9 por LcpA, LigA e LigB.....	52
<b>Figura 21</b> - Ensaio de hemólise com a proteína LcpA.....	53
<b>Figura 22</b> - Ensaio de hemólise com as proteínas LigA e LigB.....	54
<b>Figura 23</b> - FH, C4BP, e vitronectina têm sítios de ligação distintos na LcpA....	56
<b>Figura 24</b> - FH e vitronectina têm sítios de ligação distintos nas proteínas LigA e LigB.....	57

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

amp - Ampicilina

ANOVA – Análise de variância

Big - *Bacterial immunoglobulin-like*

BSA - Albumina sérica bovina

C4BP - *C4b Binding Protein*

DAF - *Decay Accelerating Factor*

DNA - Ácido desoxirribonucléico

DO - Densidade óptica

ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

Far-WB - *Far Western blotting*

FB - Fator B

FD - Fator D

FH - Fator H

FHL-1 - *Factor H like protein 1*

FHR - *Factor H related protein*

FI - Fator I

h - hora

His – histidina

IgG - Imunoglobulina G

IgM - Imunoglobulina M

IPTG - Isopropil-B-D-tiogalactopiranosídeo

kDa - kiloDalton

*L. biflexa* - *Leptospira biflexa*

*L. interrogans* - *Leptospira interrogans*

LB - Meio Luria-Bertani

LcpA - *Leptospiral complement regulator-acquiring protein A*

Lig - *Leptospira immunoglobulin-like protein*

LigA - *Leptospiral immunoglobulin-like protein A*

LigB - *Leptospiral immunoglobulin-like protein B*

LPS - Lipopolissacarídeo

M - Molar

mA - Miliampere

MAC - *Membrane Attack Complex* ou Complexo de Ataque à Membrana

MAT - Teste de Aglutinação Microscópica

MASP - Serino Proteases Associadas à MBL

MBL - Lectina Ligadora de Manose

MCP - *Membrane Cofactor Protein*

ME - Membrana Externa

MET - Microscopia Eletrônica de Transmissão

mg - Miligrama

MI - Membrana Interna

mL - Mililitro

mM - Milimolar

ng - Nanograma

NLR - *nod-like receptors*

nm - Nanômetro

OMS - Organização Mundial da Saúde

OPD - o-fenilenodiamina

PAI-1 - Inibidor do Ativador do Plasminogênio Tipo 1

PAMP - *Pathogen-Associated Molecular Patterns*

PBS - *Phosphate buffered saline*

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

PG - Peptidoglicano

PRR - Pathogen Activated Receptors

SCR - *Short Consensus Repeats*

SDS-PAGE - Eletroforese em gel de Poliacrilamida contendo SDS

SHN - Soro Humano Normal

TLR - *toll-like receptors*

TLR2 - *toll-like receptor 2*

TLR4 - *toll-like receptor 4*

µg - Micrograma

µL - Microlitro

µm - Micrômetro

µM - Micromolar

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>1.1 A leptospirose humana.....</b>	<b>16</b>
1.1.1 Ciclo de transmissão e sintomatologia da leptospirose.....	17
1.1.2 Diagnóstico da leptospirose.....	20
1.1.3 Tratamento da leptospirose.....	21
1.1.4 Vacinas contra leptospirose.....	21
<b>1.2 A bactéria <i>Leptospira</i>.....</b>	<b>22</b>
<b>1.3 Bases moleculares e imunológicas da doença.....</b>	<b>25</b>
<b>1.4 O sistema complemento.....</b>	<b>27</b>
<b>1.5 Regulação do sistema complemento.....</b>	<b>29</b>
<b>1.6 Fator H.....</b>	<b>30</b>
<b>1.7 C4b <i>Binding Protein</i> (C4BP).....</b>	<b>31</b>
<b>1.8 Vitronectina.....</b>	<b>32</b>
<b>1.9 Leptospiras e vitronectina humana.....</b>	<b>34</b>
<b>1.10 As proteínas Lig.....</b>	<b>36</b>
<b>1.11 A proteína LcpA.....</b>	<b>37</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>38</b>
<b>2.1 Objetivo geral.....</b>	<b>38</b>
<b>2.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>38</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>39</b>
<b>3.1 Soluções e reagentes utilizados.....</b>	<b>39</b>
3.1.1 Meios de Cultura.....	39
3.1.2 Soluções de Purificação de Proteínas.....	39
3.1.3 Soluções de preparação do gel SDS-PAGE.....	39
3.1.4 Soluções de eletroforese SDS-PAGE.....	39
3.1.5 Soluções de <i>Western blotting</i> .....	40
3.1.6 Soluções de ELISA.....	40
3.1.7 Soluções do ensaio de polimerização com zinco.....	40
3.1.8 Soluções para coloração por prata.....	40
3.1.9 Soluções do ensaio hemolítico.....	41
<b>3.2 Proteínas purificadas, anticorpos e soro humano normal.....</b>	<b>41</b>

<b>3.3 Expressão e purificação das proteínas recombinantes LigAC, LigBC, LigBN e LcpA.....</b>	<b>41</b>
<b>3.4 Mapeamento dos domínios das proteínas Lig e LcpA envolvidos na interação com vitronectina.....</b>	<b>43</b>
<b>3.5 Mapeamento dos sítios de vitronectina envolvidos na interação com as proteínas recombinantes.....</b>	<b>43</b>
<b>3.6 Avaliação do papel de forças iônicas nas interações das proteínas Lig e LcpA com vitronectina humana.....</b>	<b>44</b>
<b>3.7 Interação das proteínas Lig e LcpA com o componente C9.....</b>	<b>45</b>
<b>3.8 Ensaios de inibição da polimerização de C9 na presença de diferentes concentrações das proteínas recombinantes.....</b>	<b>45</b>
<b>3.9 Ensaios hemolíticos.....</b>	<b>45</b>
<b>3.10 Ensaios de competição.....</b>	<b>46</b>
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>47</b>
<b>4.1 Expressão e purificação das proteínas recombinantes LigAC, LigBC, LigBN e LcpA.....</b>	<b>47</b>
<b>4.2 Mapeamento das regiões das proteínas recombinantes LcpA, LigA e LigB envolvidas na interação com vitronectina.....</b>	<b>47</b>
<b>4.3 Mapeamento dos sítios de vitronectina envolvidos na interação com as proteínas recombinantes LcpA, LigA e LigB.....</b>	<b>48</b>
<b>4.4 Avaliação do papel das forças iônicas na interação das proteínas LcpA, LigA e LigB com vitronectina humana.....</b>	<b>50</b>
<b>4.5 Interação das proteínas recombinantes LcpA, LigA e LigB com o componente C9.....</b>	<b>50</b>
<b>4.6 Ensaios de inibição da polimerização de C9 na presença de LcpA, LigA e LigB.....</b>	<b>51</b>
<b>4.7 Inibição da formação do MAC por LcpA, LigA e LigB utilizando um ensaio hemolítico.....</b>	<b>53</b>
<b>4.8 Ensaios de competição.....</b>	<b>54</b>
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>58</b>
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>62</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>63</b>



# 1 INTRODUÇÃO

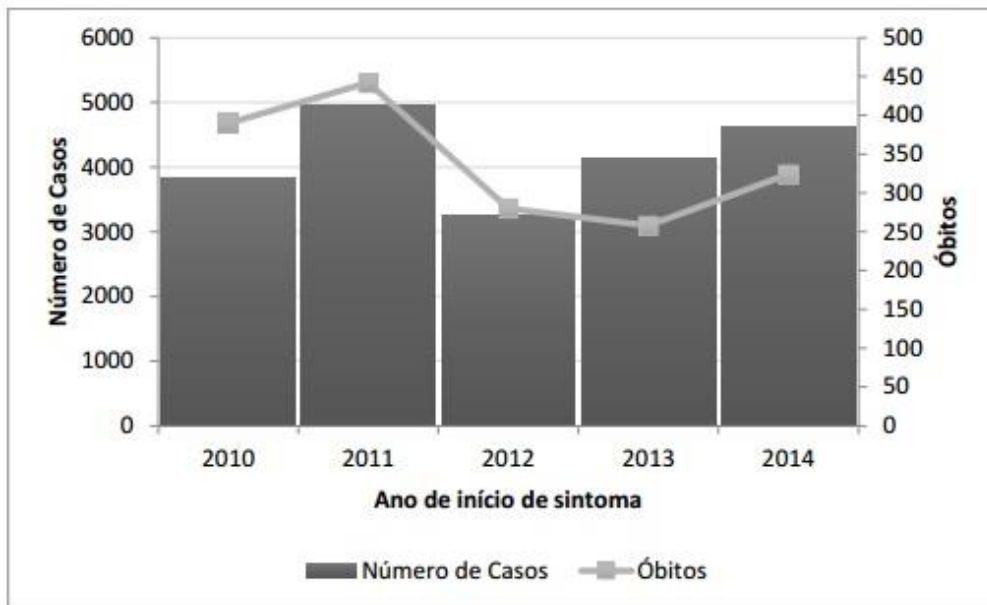
## 1.1 A leptospirose humana

A leptospirose é uma zoonose de distribuição mundial causada por bactérias patogênicas do gênero *Leptospira* que são transmitidas principalmente pelo contato com a urina de animais infectados. A doença constitui um importante problema de saúde pública, com uma maior incidência nas regiões tropicais e subdesenvolvidas, devido à prevalência de bactérias em ambientes quentes e úmidos, além de fatores relacionados a problemas de saneamento básico e enchentes decorrentes de fortes chuvas (BHARTI et al., 2003; FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001). Há também relatos de infecção por leptospirosas decorrente da prática de esportes aquáticos e pela exposição ocupacional, como por exemplo, em arrozais, fazendas e abatedouros (PICARDEAU, 2015).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a incidência anual é de aproximadamente cinco casos a cada 100.000 habitantes, excluindo surtos. A estimativa é baixa, uma vez que diversos casos de leptospirose não são notificados e tantos outros não são diagnosticados, devido à falta de conscientização sobre a doença, dificuldades em realizar testes de confirmação laboratorial e pelo fato de alguns dos sintomas se sobreporem àqueles observados em muitas outras patologias. Portanto, a doença é certamente subdiagnosticada (World Health Organization – WHO, 2011).

No Brasil, a leptospirose humana é uma doença de notificação compulsória desde 1985. No período de 2010 a 2014 foram confirmados no Brasil 20.810 casos de leptospirose, representando uma média anual de 4.162 casos. O número de óbitos foi de 1.694, representando uma média de 339 óbitos por ano e mais de 8% de letalidade (Figura 1). Dos casos confirmados, 65,3% evoluíram para a fase grave da doença e exigiram hospitalização (MINISTÉRIO DA SAÚDE - BRASIL, 2016).

**Figura 1** - Número de casos confirmados e óbitos por leptospirose no Brasil de 2010 a 2014.

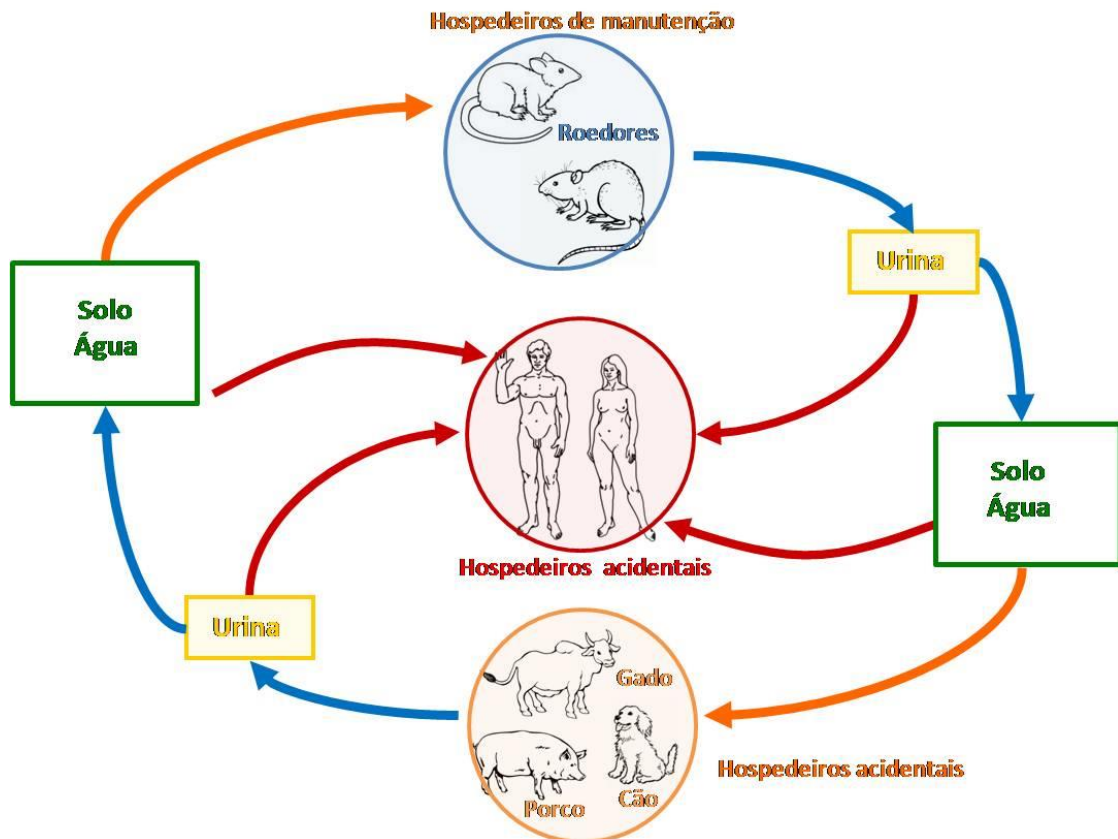


Número de casos confirmados separados por ano (2010-2014) em cinza escuro e linha de óbitos por leptospirose em cinza claro. Fonte: SINAN-NET. Dados obtidos em 29.01.2016, sujeitos a alteração.

#### 1.1.1 Ciclo de transmissão e sintomatologia da leptospirose

As leptospirosas causam infecções assintomáticas nos hospedeiros de manutenção, colonizando seus túbulos renais proximais e sendo eliminadas na urina desses animais. São capazes de sobreviver por dias e até semanas no solo ou na água. O principal reservatório urbano da doença é o *Rattus norvegicus* (BHARTI et al., 2003; FAINE et al., 1999). Os seres humanos, cães, bovinos e suínos são considerados hospedeiros acidentais, portanto suscetíveis à doença, e sua infecção se dá pela exposição ao solo ou à água contaminados com a urina de animais infectados (Figura 2). Infecções no ramo veterinário podem trazer grandes prejuízos econômicos à pecuária (KO et al., 2009). Além dos animais mencionados, há relatos de uma gama de hospedeiros infectados por leptospirosas como morcegos, cervos, ovelhas, cabras, capivaras, cavalos, jegues, diversos roedores (cobaias, hamsters e gerbis), primatas (macacos-prego, macacos-esquilo, saguis, micos), outros animais selvagens (rinocerontes, tamanduás-bandeira, ursos polares, cães selvagens, leões marinhos, focas, elefantes marinhos), além de répteis e anfíbios (cobras, tartarugas, rãs e sapos) (ADLER, 2015).

**Figura 2 - O ciclo de transmissão da leptospirose.**



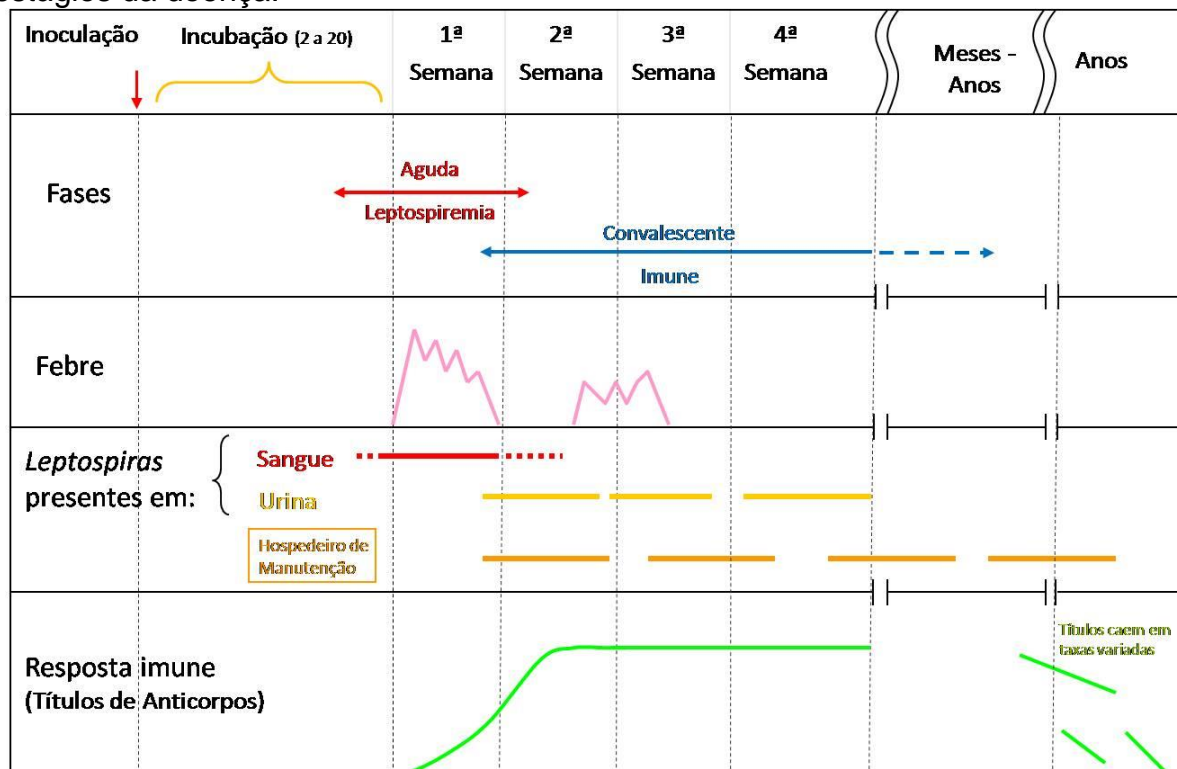
Os hospedeiros de manutenção, como os roedores, eliminam as bactérias através da urina, que pode contaminar os hospedeiros acidentais, como os seres humanos, entre outros animais domésticos e selvagens, indiretamente através do solo e da água contaminados e também diretamente através do contato com esta urina (Lídia Miragaia, 2016).

As leptospiros entram por abrasões na pele ou por membranas mucosas e podem rapidamente se espalhar pela corrente sanguínea atingindo principalmente o fígado, rins e pulmões (FAINE et al., 1999). Seu período de incubação varia de 2 a 20 dias e a doença segue tradicionalmente um curso bifásico. A fase aguda ou septicêmica é caracterizada pela presença de leptospiros na corrente sanguínea e dura aproximadamente uma semana. A fase convalescente ou imune é caracterizada pela produção de anticorpos e eliminação de leptospiros através da urina (Figura 3). Grande parte das complicações típicas da doença, como icterícia grave, disfunção renal e hemorragia pulmonar decorrem da internalização de leptospiros nos tecidos durante a fase imune (LEVETT, 2001; MCBRIDE et al., 2005).

Na maioria dos casos, a leptospirose pode se apresentar como uma infecção subclínica, com sintomas semelhantes aos da gripe, como febre e dor de cabeça. Os casos que evoluem para uma doença sistêmica grave (Síndrome de *Weil*) são

caracterizados por insuficiência renal, hepática e hemorragia pulmonar. Uma porcentagem de pacientes (de 10 a 15%) evolui para formas graves da doença, que pode progredir rapidamente levando a óbito (LEVETT, 2001). Essas diferentes manifestações podem ser explicadas pela estirpe de leptospiras infectante, por seu grau de virulência, pela carga bacteriana ou pelo estado de saúde e predisposição do paciente (BHARTIE et al., 2003; PICARDEAU, 2015).

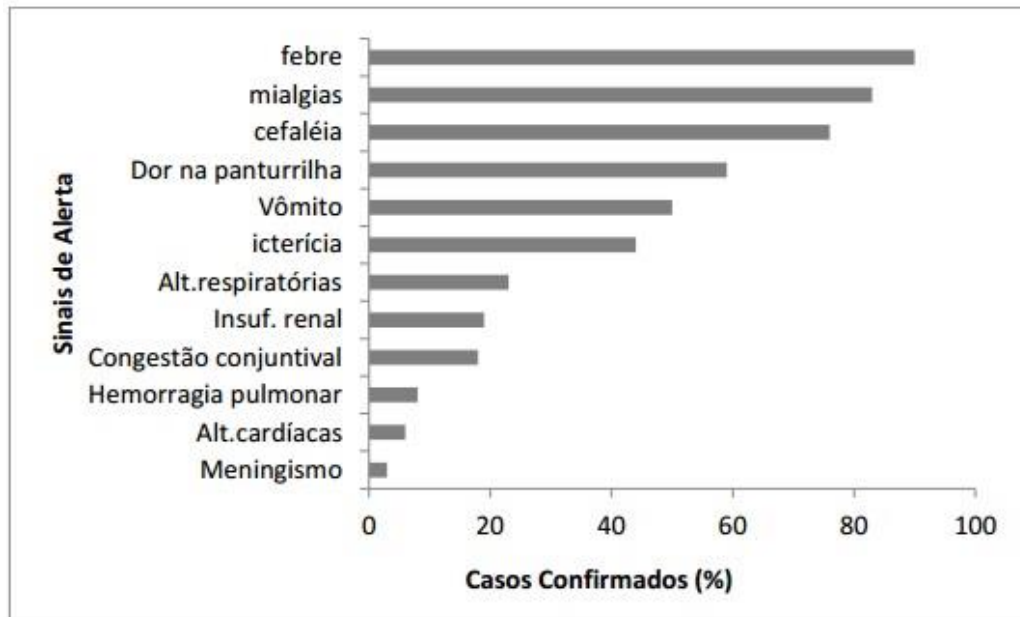
**Figura 3** - Natureza bifásica da leptospirose e aspectos relevantes em diferentes estágios da doença.



A fase aguda (Leptospiremia) ocorre na 1ª semana da doença e a partir da 2ª semana ocorre a fase convalescente (imune), onde há a produção de anticorpos. Episódios de febre acontecem na fase aguda porém pode manifestar durante a fase imune também. As leptospiras são encontradas no sangue durante a 1ª semana e após na urina. (Adaptado de Levett, 2001).

Como o espectro de manifestações clínicas é bastante variável, a doença é comumente confundida com outras enfermidades e muitas vezes os pacientes não chegam a procurar assistência médica. Os sinais e sintomas mais relatados são: febre (90%), mialgia (83%), cefaléia (76%), dores na panturrilha (59%), vômito (50%) e icterícia (44%), segundo o Ministério da Saúde (Figura 4).

**Figura 4 -** Sinais e sintomas dos casos confirmados de leptospirose.



Os sinais e sintomas mais relatados dos casos confirmados de leptospirose no Brasil de 2010 a 2014. Fonte: SINAN-NET. Dados obtidos em 29.01.2016, sujeitos a alteração.

#### 1.1.2 Diagnóstico da leptospirose

A eficácia do diagnóstico de leptospirose é dependente da fase em que a doença se encontra. Na fase aguda da doença, as bactérias podem ser isoladas de amostras de sangue e líquido cérebro-espinhal. A partir da segunda semana, podem ser isoladas da urina. No entanto, a taxa de crescimento das leptospiras é extremamente lenta e esperar o crescimento dessas bactérias isoladas de amostras de pacientes pode comprometer o tratamento e a necessidade de um diagnóstico rápido.

A maioria dos casos de leptospirose é confirmada por sorologia; porém, o diagnóstico da doença nem sempre é trivial. Conforme descrito anteriormente, os sintomas assemelham-se àqueles presentes em diversas outras doenças. Portanto, a realização de um diagnóstico correto muitas vezes depende de um profissional de saúde atento aos sintomas. Durante a fase aguda, o diagnóstico pode ser feito por PCR. A cultura do sangue, líquido ou urina também é uma opção, embora gere resultados tardios devido à lenta taxa de crescimento dessas bactérias. Na transição entre a fase aguda e a fase imune recomenda-se a realização de um ELISA para pesquisa de anticorpos IgM contra *Leptospira*. Na fase imune, o método de referência para a confirmação de leptospirose de acordo com a OMS é o teste de aglutinação microscópica (MAT). Esse teste além de ser relativamente econômico,

possui uma sensibilidade de 92% e especificidade de 95% (LEVETT, 2001). Para a realização do MAT, diluições variadas do soro do paciente são incubadas com uma bateria de cepas de leptospiros, usadas como antígenos. Após um breve período de incubação, a reação antígeno-anticorpo é analisada por microscopia para a visualização de aglutinação. O título de anticorpos é determinado como a diluição mais alta de soro na qual ocorreu 50% de aglutinação. Duas amostras de soro devem ser colhidas com um intervalo mínimo de duas semanas. Soroconversão ou um aumento de quatro vezes no título de anticorpos é considerado um resultado positivo. Embora o MAT seja um método simples e referência para o diagnóstico, não permite a detecção da doença em sua fase inicial, já que é dependente de anticorpos e estes só começam a ser detectados após uma semana. Além disso, essa técnica requer profissionais de saúde treinados em microscopia e infraestrutura para a manutenção de diferentes espécies de leptospiros (AHMED et al., 2013; LEVETT, 2001).

#### 1.1.3 Tratamento da leptospirose

O tratamento da leptospirose é feito com antibióticos. No caso da doença leve, o tratamento do paciente é feito com 100 mg de doxiciclina, duas vezes ao dia durante uma semana. Em casos graves, são administradas altas doses de penicilina G intravenosa a cada seis horas durante uma semana. Nos casos graves que evoluem para insuficiência renal e hemorragias pulmonares, realizam-se terapias de suporte como hemodiálise e ventilação mecânica, respectivamente. Outros antibióticos orais como amoxicilina, ampicilina e eritromicina podem ser administrados também (BHARTI et al., 2003; FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001).

#### 1.1.4 Vacinas contra leptospirose

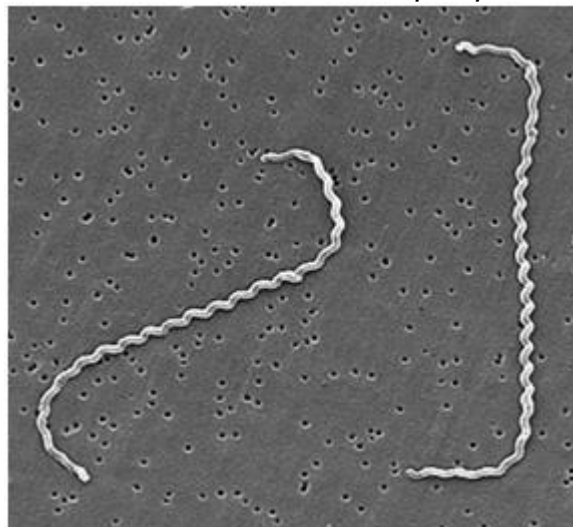
Atualmente, não há vacina licenciada contra leptospirose humana no Brasil. Vacinas desenvolvidas a partir da preparação de leptospiros mortos por calor ou formalina (bacterinas) já foram testadas em diversos países como Japão (KITAOKA, INOUE, 1952), Cuba (MARTÍNEZ et al., 2004) e China (YAN et al., 2003). No entanto, a resposta imune gerada por bacterinas não induz memória imunológica, não é dependente de linfócitos T e é sorovar-específica. Portanto, tais vacinas

geram um curto período de proteção apenas contra espécies presentes na preparação (FAINE et al., 1999). Já a vacina para o uso veterinário, apesar de apresentar os mesmos problemas, é licenciada em vários lugares do mundo, inclusive no Brasil, ficando a critério do dono ou do produtor de animais domésticos e selvagens a vacinação anual (BHARTI et al., 2003; KOIZUMI, WATANABE, 2005).

## 1.2 A bactéria *Leptospira*

As bactérias causadoras da leptospirose pertencem ao gênero *Leptospira*, à família *Leptospiraceae* e à ordem *Spirochaetales*, que inclui também os gêneros *Borrelia* e *Treponema*, agentes causadores da doença de Lyme e da sífilis, respectivamente. São espiroquetas altamente móveis, finas, longas e possuem as extremidades arqueadas (Figura 5). Apresentam aproximadamente 0,1  $\mu\text{m}$  de largura e 6 a 20  $\mu\text{m}$  de comprimento. Possuem também dois flagelos periplasmáticos com inserções polares que conferem movimentos rotacionais e translacionais. São aeróbias e crescem bem a temperaturas de 28 °C a 30 °C no meio ambiente e a 37 °C durante a infecção. São capazes de formar biofilmes que facilitam uma eficiente colonização e permanência em nichos específicos (FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001; RISTOW et al., 2008).

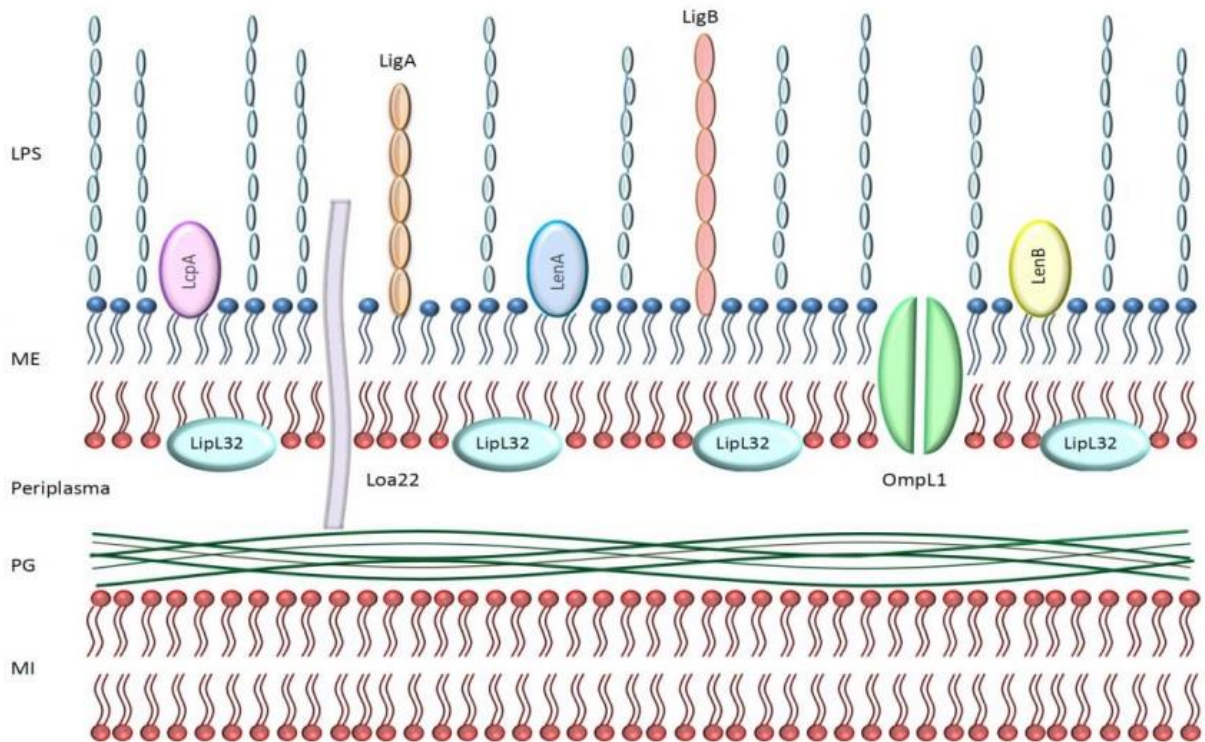
**Figura 5** - Microscopia eletrônica de varredura de *Leptospira*.



Microscopia eletrônica de varredura de *Leptospira interrogans* sorovar *Icterohaemorrhagiae* sobre membrana de filtro de 0,2  $\mu\text{m}$  (Levett, 2001).

Como as demais espiroquetas, apresentam uma estrutura de membrana dupla, compartilhando características de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. As leptospiros possuem uma membrana dupla contendo lipopolissacarídeos (LPS) como característica de Gram-negativas, porém, apresentam uma parede de peptideoglicanos estritamente associada à membrana citoplasmática, típica de bactérias Gram-positivas (Figura 6). Sua membrana externa contém fosfolipídeos, lipoproteínas, lipopolissacarídeos e porinas, que permitem a troca de solutos entre o espaço periplasmático e o meio ambiente. As leptospiros utilizam álcoois e ácidos graxos como fonte de carbono e energia (CULLEN et al., 2004; FAINE et al., 1999; KO et al., 2009).

**Figura 6** - Representação esquemática da membrana de *Leptospira*.



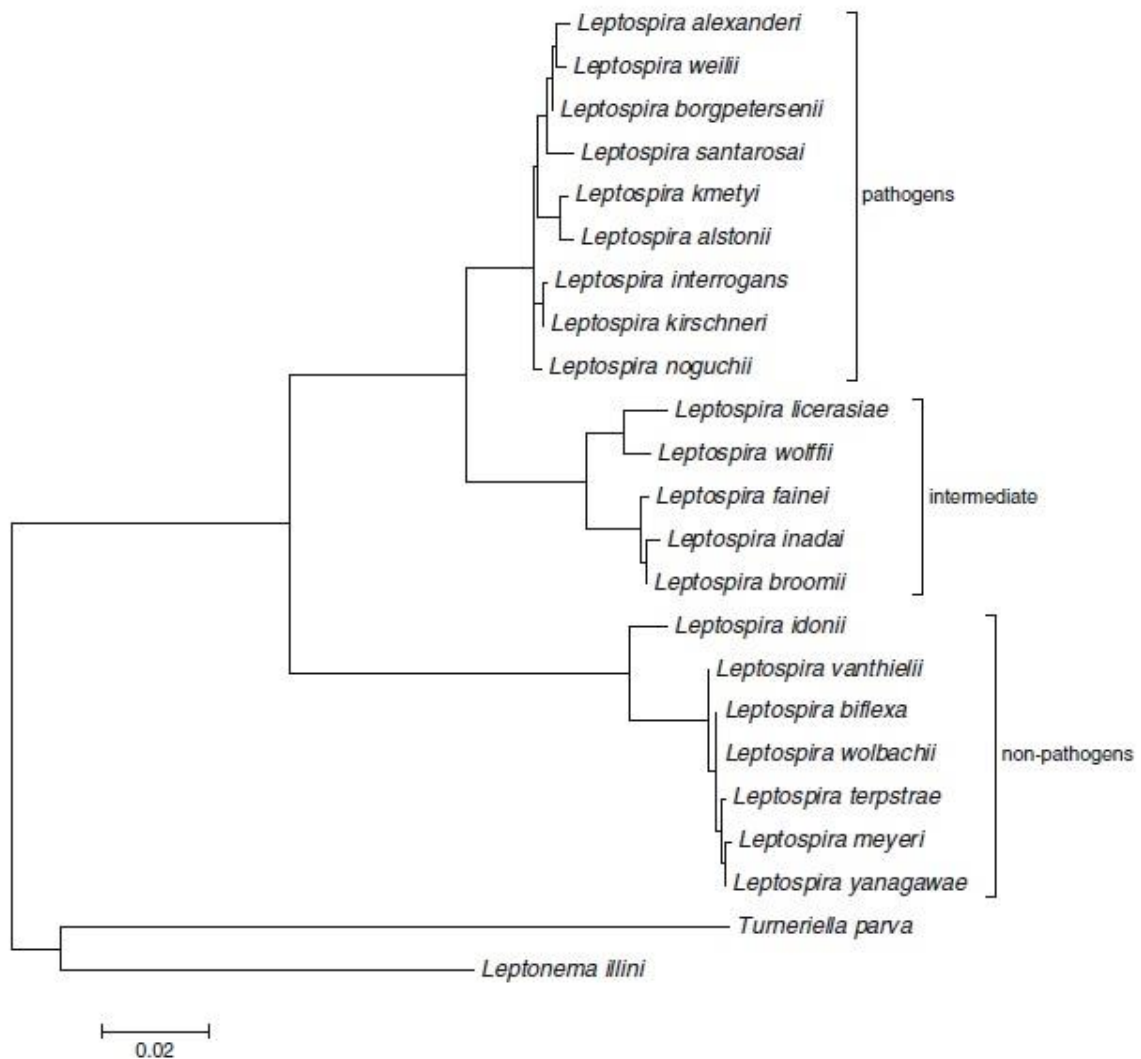
Na representação esquemática pode-se notar que a membrana interna (MI) está intimamente associada à parede celular de peptideoglicano (PG), a qual é separada da membrana externa (ME) pelo espaço periplasmático, no qual se localiza o endoflagelo (não representado na figura). Dentre os componentes da ME da bactéria destacam-se o lipopolissacarídeo (LPS), proteína transmembrana, como a porina OmpL1, e diversas proteínas expostas na superfície como LigA, LigB, LenA, LenB, LcpA e Loa22. A lipoproteína LipL32 é representada como uma proteína de subsuperfície (Fraga et al., 2010).

Inicialmente o gênero *Leptospira* foi dividido em duas espécies: *L. biflexa*, que englobava as bactérias saprófitas e de vida livre, e *L. interrogans*, que reunia as patogênicas (LEVETT, 2001). Atualmente as leptospiros são classificadas em mais



de 300 sorovares, distribuídos em espécies patogênicas, intermediárias e saprófitas. Há dois tipos de classificação taxonômica, um baseado em determinantes antigênicos e outro em determinantes genéticos. A primeira classificação baseia-se em testes sorológicos e a distinção entre os sorovares é determinada pela heterogeneidade estrutural dos carboidratos do lipopolissacarídeo (LPS). Esses sorovares antigenicamente relacionados são agrupados em sorogrupos. Já a segunda classificação, a genotípica, baseia-se na hibridação por homologia de DNA. Até então, foram determinadas 21 espécies genômicas diferentes de leptospiros (Figura 7) (ADLER, 2015; BRENNER et al., 1999; SMYTHE et al., 2013).

**Figura 7** - Espécies de *Leptospira* determinadas segundo a classificação genotípica.



Espécies de *Leptospira* determinadas segundo a classificação genotípica divididas em três grupos: patogênicas, intermediárias e não patogênicas (Adler, 2015).

### 1.3 Bases moleculares e imunológicas da doença

Leptospiras entram no hospedeiro através de abrasões na pele ou mucosas, e podem rapidamente atingir a corrente sanguínea e conseqüentemente os órgãos-alvo. Leptospiras não-patogênicas conseguem penetrar e aderir, porém são rapidamente eliminadas da corrente sanguínea. Já as patogênicas são capazes de se multiplicar e desencadear uma resposta imune específica (FAINE et al., 1999; MERI et al., 2005). Isto se deve, basicamente, a dois mecanismos: a capacidade que essas bactérias possuem de aderir a células e a proteínas de matriz extracelular, e, a habilidade de escapar dos mecanismos de defesa inata do hospedeiro.

Leptospiras patogênicas possuem estratégias de invasão, disseminação e permanência no hospedeiro. Após a entrada no organismo, estas bactérias aderem a componentes de matriz extracelular como colágeno tipo I e IV, laminina, fibronectina, elastina (ATZINGEN et al., 2008; BARBOSA et al., 2006; HAUK et al., 2008; LIN et al., 2009) e também a células endoteliais, fibroblastos, monócitos, macrófagos (MERIEN et al., 1997; THOMAS et al., 1990). Conseguem sobreviver na circulação devido à capacidade de inativar o sistema complemento, primeira linha de defesa imune contra microrganismos invasores (BARBOSA et al., 2009, 2010; CASTIBLANCO-VALENCIA et al., 2012; MERI et al., 2005; VERMA et al., 2006).

Leptospiras patogênicas também possuem hemolisinas, proteínas com a capacidade de romper membranas de eritrócitos e provocar lise celular, liberando assim grandes quantidades de ferro indispensáveis para a sobrevivência da bactéria (WANDERSMAN et al., 2000). Essa hemólise observada em pacientes com leptospirose pode ser atribuída às hemolisinas, à atividade de fosfolipases (TROWBRIDGE et al., 1981), de esfingomielinases (SEGERS et al., 1990) e de outras proteínas auxiliares secretadas (LEE et al., 2000).

O sistema imune inato possui um papel crucial no reconhecimento e na eliminação de leptospiras. Leptospiras não-patogênicas são mortas em poucos minutos na presença de soro humano, ao passo que as patogênicas, quando virulentas, resistem à ação lítica do complemento. Como são patógenos extracelulares, a resposta imune adquirida do hospedeiro depende da produção de anticorpos e, conforme dito anteriormente, a maioria dos anticorpos específicos produzidos durante a infecção são contra o LPS (TANG et al., 2015). Em diversos

modelos experimentais, ficou evidente que a fagocitose de leptospiras por neutrófilos e macrófagos é efetiva apenas quando a bactéria é opsonizada por anticorpos IgG específicos (BANFI et al., 1984; WANG et al., 1984). Além de opsonizar, esses anticorpos podem aglutinar leptospiras e ativar a via clássica do sistema complemento. O papel da imunidade celular na eliminação de leptospiras permanece pouco compreendido. Curiosamente, embora essas bactérias não sejam consideradas patógenos intracelulares, há relatos de que *L. interrogans* é capaz de escapar do fagolisossoma para o citosol de macrófagos humanos (TANG et al., 2015).

Uma vez no hospedeiro, leptospiras podem ser detectadas pelo sistema imune através dos *Pathogen Activated Receptors* (PRRs), que reconhecem motivos moleculares conhecidos como *Pathogen-Associated Molecular Patterns* (PAMPs). Duas principais famílias de PRRs desempenham um papel fundamental no reconhecimento de patógenos: os *toll-like receptors* (TLRs) e os *nod-like receptors* (NLRs) (MOGENSEN, 2009). As bactérias são detectadas também pelas proteínas solúveis e insolúveis do sistema complemento, mais especificamente pela via alternativa desse sistema, que será detalhado adiante.

O LPS de bactérias Gram-negativas é capaz de ativar o TLR4. Contudo, o LPS de leptospiras é menos endotóxico que o de outras bactérias ativando macrófagos humanos pelo TLR2 (MILLER et al., 2005; WERTS et al., 2001). Em camundongos, que são animais resistentes à leptospirose, foi observada ativação de receptores do tipo TLR2 e TLR4. Acredita-se que esta diferença possa estar relacionada com a susceptibilidade ou resistência à infecção (CHASSIN et al., 2009; NAHORI et al., 2005).

As leptospiras possuem mais um mecanismo importante no que diz respeito à patogênese. Elas são capazes de formar biofilmes que ajudam as bactérias a sobreviver tanto no meio ambiente quanto no hospedeiro (RISTOW et al., 2008). A formação desses biofilmes é uma importante barreira entre o patógeno e o sistema imune, pois impede a atuação de células e moléculas efetoras (BRIHUEGA et al., 2012).

## 1.4 O sistema complemento

O sistema complemento representa a primeira linha de defesa do hospedeiro contra microorganismos. Ele desempenha um papel crucial na imunidade inata e também um importante papel na imunidade adaptativa (dependente de anticorpos), já que sua ativação modula diversas respostas específicas a antígenos externos e a eliminação destes (MORGAN et al., 2005). Entre suas funções biológicas estão: a produção de opsoninas (fragmentos iC3b, C3b, C3d); a produção de fatores quimiotáticos, especialmente C5a, capazes de atrair células inflamatórias para o sítio de infecção; produção de anafilatoxinas capazes de desgranular mastócitos e basófilos, liberando assim vários mediadores inflamatórios; lise celular provocada pela formação do poro na superfície das células (*Membrane Attack Complex*, MAC); efeito adjuvante, causando aumento na produção de anticorpos pelos linfócitos; e remoção de imunocomplexos e células apoptóticas (KÖHL, 2006; SCHNEIDER et al., 2007; WALPORT, 2001).

Trata-se de um sistema que se ativa como uma cascata, composto por mais de 30 proteínas solúveis ou associadas à membrana. A exposição de microorganismos ao complemento pode levar à ativação por três diferentes vias: a via alternativa, a via clássica e a via das lectinas (Figura 8). Essas três vias culminam em uma etapa comum a todas, a via terminal. A via terminal é responsável pela montagem do complexo de ataque à membrana (MAC) que vai levar à lise osmótica da célula.

A primeira via descoberta foi a clássica, que é ativada principalmente por complexos antígeno-anticorpo. A molécula C1q se liga a esses complexos e ativa C1r, que por sua vez ativa C1s. Uma vez ativado, C1s cliva a molécula de C4 e C2, gerando os fragmentos C4a e C4b, C2a e C2b, respectivamente. C4b liga-se a C2a e forma a chamada C3 convertase da via clássica (C4b2a), uma enzima que vai clivar moléculas de C3, proteínas centrais do sistema complemento.

A via das lectinas é ativada pela ligação da lectina ligadora de manose (MBL) a resíduos de açúcares na superfície bacteriana, em seguida ativando serino proteases associadas à MBL (MASPs), que são capazes também de clivar as moléculas de C4 e C2, formando a C3 convertase (C4b2a) da via das lectinas, similar à da via clássica.

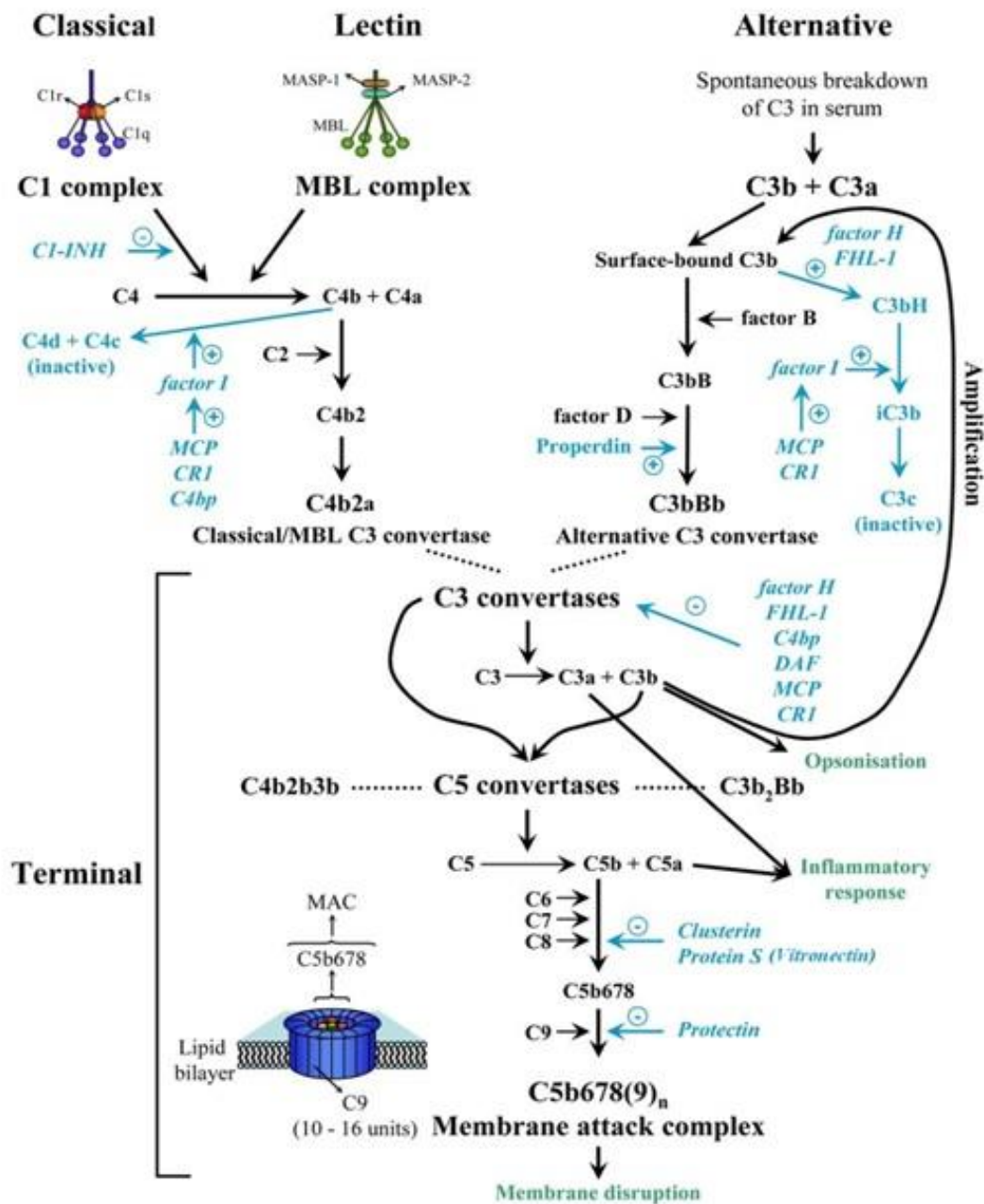
Outra via de ativação do sistema complemento, a via alternativa, é ativada a partir da hidrólise espontânea da ligação de tiol-éster localizada na cadeia alfa do

componente C3, gerando C3(H<sub>2</sub>O). Esta molécula permite a ligação de uma proteína plasmática conhecida como Fator B (FB), formando o complexo C3(H<sub>2</sub>O)B. O FB ligado à molécula de C3 é então clivado pela enzima denominada Fator D (FD), gerando a molécula C3(H<sub>2</sub>O)Bb e um fragmento menor do FB. Essa molécula é capaz de clivar moléculas de C3, gerando os fragmentos C3a e C3b. Assim como o C3(H<sub>2</sub>O), o C3b apresenta um sítio de ligação ao FB, formando o complexo C3bBb após a clivagem de FB pelo FD. Esse complexo representa a C3 convertase da via alternativa.

A função das C3 convertases é a clivagem de mais moléculas de C3, em C3a e C3b. O C3b gerado é capaz de se ligar diretamente à C3 convertase da via alternativa, formando o complexo C3bBbC3b e à C3 convertase das vias clássica e das lectinas, formando o complexo C4bC2aC3b. Esses complexos são chamados de C5 convertases, e têm a função de clivar moléculas de C5.

A via terminal do sistema complemento se inicia com a clivagem de C5 em C5a e C5b, o qual é capaz de se ligar a moléculas C6 e C7 formando um complexo que se insere na membrana da célula. A molécula C8 se insere nesse complexo e então diversas moléculas de C9 se ligam ao complexo C5b678 formando um poro denominado Complexo de Ataque à Membrana (MAC). Os poros geram um desbalanço eletrolítico entre o meio interno e o meio externo e acaba por romper a célula (MORGAN, HARRIS, 1999; WALPORT, 2001).

**Figura 8** - Três vias de ativação do sistema complemento: alternativa, clássica e das lectinas.



As três vias de ativação do sistema complemento: alternativa (espontânea), clássica (complexos antígeno-anticorpo) e das lectinas (açúcares na superfície bacteriana). Essas três vias culminam em uma via comum, a via terminal que vai formar o complexo de ataque à membrana (MAC) e consequentemente a lise da célula. Reguladores das vias estão indicados em cor azul e funções efetoras em verde (Schroeder et al., 2009).

## 1.5 Regulação do sistema complemento

Para evitar uma ativação inadequada com consequentes danos às células do hospedeiro, além do consumo exacerbado de energia e proteínas da cascata, é

fundamental que exista uma regulação precisa dessa cascata. Esse controle é mediado por diversos reguladores que levam à degradação de C3b/C4b, facilitam a dissociação das convertases ou impedem a inserção do MAC nas células.

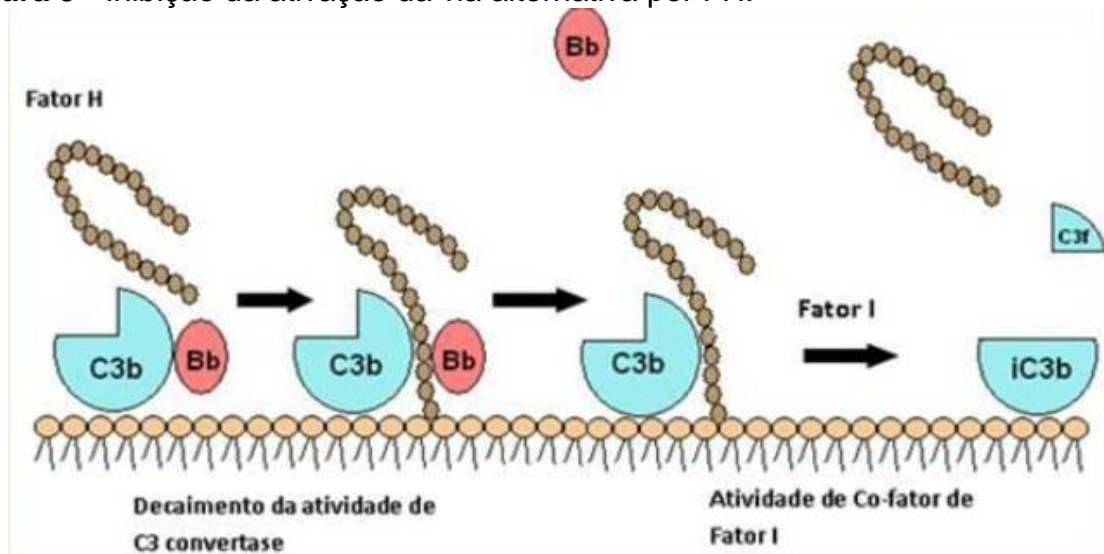
Entre os principais reguladores solúveis do sistema complemento estão o Fator H (FH), o C4b *Binding Protein* (C4BP) e a vitronectina, responsáveis pela regulação da via alternativa, da via clássica e das lectinas, e da via terminal, respectivamente. Entre os reguladores associados às células destacam-se: *Membrane Cofactor Protein* (MCP), *Decay Accelerating Factor* (DAF), CR1, entre outros.

Diversos microorganismos expressam proteínas de superfície que mimetizam esses reguladores ou a eles se ligam como uma estratégia para sobreviver no hospedeiro (MERI et al., 2006). Dados de nosso grupo indicam que leptospiros patogênicos possuem mecanismos de evasão ao complemento e algumas proteínas de superfície da bactéria já foram caracterizadas como ligantes dos reguladores negativos Fator H e C4BP (BARBOSA et al., 2010; CASTIBLANCO-VALENCIA et al., 2012; SILVA et al., 2015). Ainda, dados oriundos deste projeto nos levam a concluir que leptospiros também são capazes de controlar a via terminal do complemento mediante a interação com vitronectina. Adiante serão detalhados os três principais reguladores que foram alvos de estudo neste projeto, envolvidos na evasão ao complemento por leptospiros patogênicos: Fator H, C4BP e vitronectina.

## 1.6 Fator H

O Fator H é o principal regulador negativo da via alternativa do sistema complemento. Ele é composto por 20 domínios globulares conhecidos como *Short Consensus Repeats* (SCRs), possui 155 kDa e é o mais abundante membro entre as proteínas da família do FH. Sua concentração sérica varia de 242 a 759 µg/mL (DE PAULA et al., 2003). Vale lembrar que diversas proteínas relacionadas compõem essa família: *Factor H-like protein 1* (FHL-1) e cinco *Factor H-related proteins* (FHR-1, -2, -3, -4 and -5). A porção N-terminal do FH (SCR 1-4) é a região que tem função de co-fator, regulando a atividade de FI, que por sua vez cliva a molécula de C3b em C3f e iC3b. A porção C-terminal do FH (SCR 18-20) possui sítios de ligação à heparina, C3b, C3d, e a diversos fatores de virulência microbianos (SHERKA et al., 2008).

**Figura 9** - Inibição da ativação da via alternativa por FH.



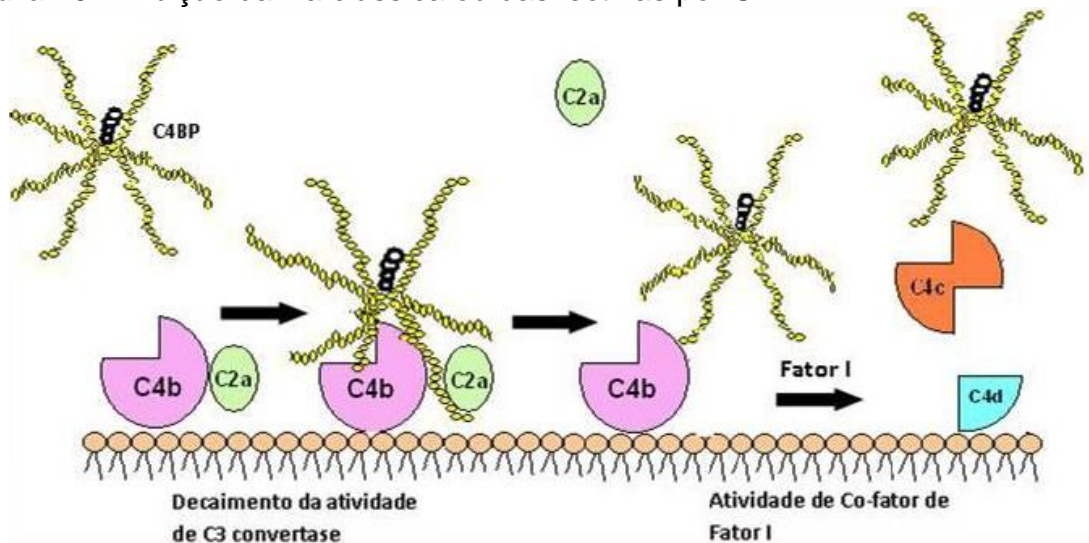
Ao se ligar em C3b, o Fator H desloca a interação entre C3b e Bb, desfazendo o complexo C3bBb, a C3 convertase da via alternativa. Também atua como co-fator de Fator I na clivagem de C3b em iC3b. Em ambas as funções, Fator H impede a formação/manutenção da C3 convertase da via alternativa, interrompendo assim a sua contínua ativação (Adaptado de Morgan, Harris, 1999).

### 1.7 C4b Binding Protein (C4BP)

O C4BP é uma glicoproteína plasmática com cerca de 570 kDa, presente no plasma em três isoformas distintas. A principal,  $\alpha7/\beta1$ , é composta estruturalmente por sete cadeias  $\alpha$  idênticas de 70 kDa e uma única cadeia  $\beta$  de 45 kDa. Essas cadeias são unidas por pontes dissulfeto na região C-terminal (PERSSON et al., 2005). O C4BP é o principal regulador negativo da via clássica e das lectinas atuando como co-fator de Fator I na degradação de C4b (Figura 10) e também previne e acelera o decaimento da C3 convertase (C4b2a) das vias clássica e das lectinas.



**Figura 10** - Inibição da via clássica ou das lectinas por C4BP.



Ao se ligar em C4b, C4BP desloca a interação entre C4b e C2a, e, além disso, atua como co-fator de Fator I na clivagem de C4b em C4c e C4d. Em ambas as atividades, C4BP impede a formação/manutenção da C3 convertase das vias clássica e das lectinas, interrompendo assim a contínua ativação das mesmas (Adaptado de Morgan, Harris, 1999).

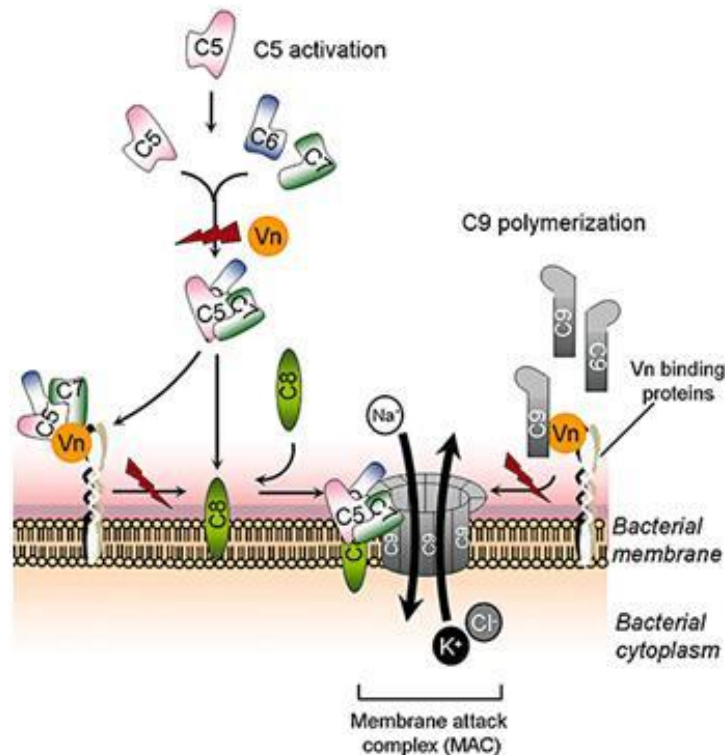
## 1.8 Vitronectina

A vitronectina é uma glicoproteína com propriedades de adesão similares às apresentadas pela fibronectina e recebeu, inicialmente, o nome de Proteína S. Anos mais tarde, verificou-se que esta proteína, presente tanto na circulação quanto nos tecidos, possuía a capacidade de aderir a superfícies vítreas e a células e, portanto, passou a ser conhecida por vitronectina (HAYMAN et al., 1983).

Predominantemente sintetizada no fígado, a vitronectina é secretada no plasma e interage com diversos ligantes, participando de vários processos biológicos. Possui papel na adesão de células à matriz extracelular e na diferenciação e proliferação celulares, participa do processo de coagulação e interfere na regulação da via terminal do complemento. Em condições fisiológicas, duas formas monoméricas de vitronectina estão presentes na circulação: uma contém 65 e a outra 75 kDa. A forma multimérica desta glicoproteína é encontrada na matriz extracelular ou associada a tecidos (STOCKMANN et al., 1993).

A vitronectina liga-se diretamente a proteínas do sistema complemento e modula suas funções (SINGH et al., 2010). Interage com C5b-7, impedindo que este complexo se insira na membrana da célula, e também se liga a C9, impedindo sua polimerização e a formação do complexo de ataque à membrana (Figura 11).

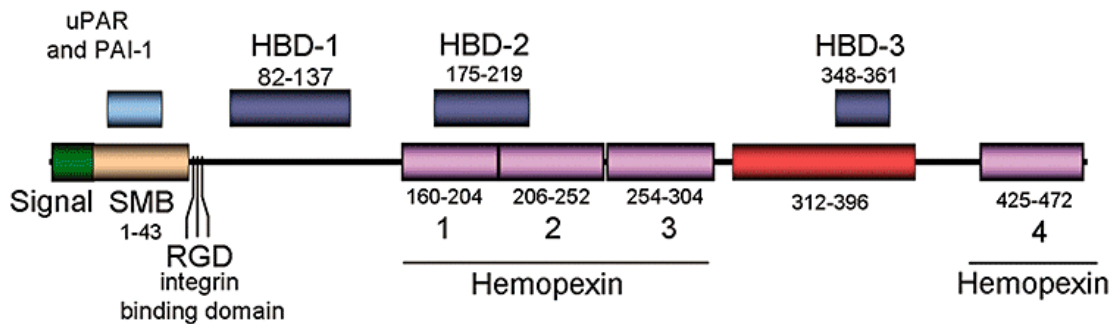
**Figura 11** - Funções regulatórias da vitronectina.



A vitronectina inibe a formação do complexo C5b-7 e a polimerização de C9. Portanto quando ligada à membrana da bactéria inibe a formação do MAC e protege a bactéria contra lise. (Adaptado de Singh et al., 2010).

No que diz respeito à estrutura, a vitronectina possui domínios que interagem com diversos ligantes. Em sua porção N-terminal encontra-se o domínio somatomedina B, com 43 aminoácidos, que interage com o inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 (PAI-1), seguido pela sequência tripeptídica Arg-Gly-Asp (RGD), comum a proteínas com propriedades de adesão, como fibronectina, fibrinogênio e fator de von Willebrand. Possui também três domínios de ligação à heparina e quatro domínios hemopexina-like, supostamente envolvidos na interação com o grupamento heme (SINGH et al., 2010) (Figura 12).

**Figura 12** - Modelo esquemático dos domínios presentes na molécula de vitronectina.



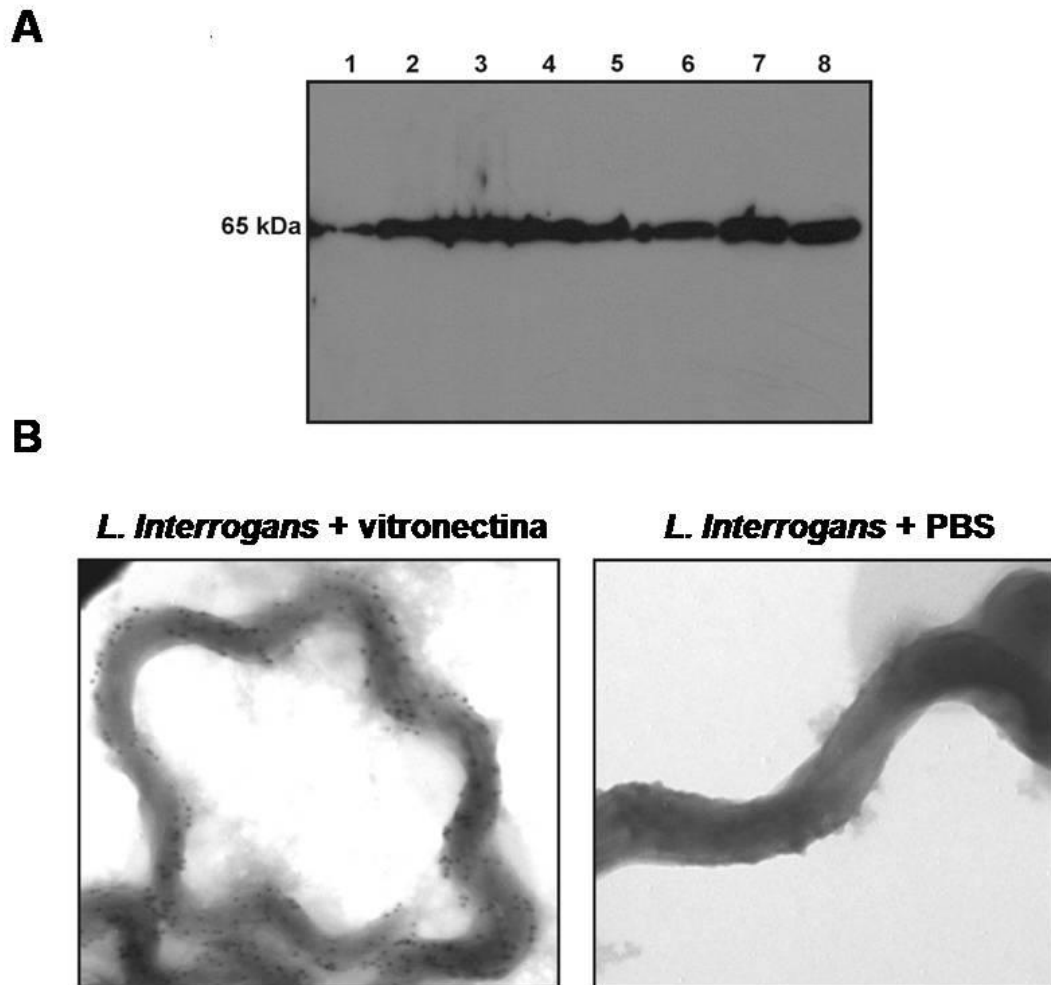
Modelo esquemático da molécula de vitronectina contendo um peptídeo sinal (verde), um domínio somatomedina B (azul claro), um domínio RGD de ligação a integrina, três domínios de ligação a heparina (azul escuro) e quatro domínios de ligação a hemopexina-like (lilás). (Adaptado de Singh et al., 2010).

A interação da vitronectina com diversos patógenos tem sido estudada por vários grupos. Há relatos de que esta molécula interage com bactérias Gram-negativas, como *Haemophilus influenza*, *Moraxella catarrhalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Neisseria meningitidis* e *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Clostridium difficile*, *Helicobacter pylori* e *Porphyromonas gingivalis*, e também com bactérias Gram-positivas, dentre as quais várias espécies de *Streptococcus*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, e *Enterococcus faecalis* (revisado por SINGH et al., 2010). Esta interação pode ser altamente vantajosa ao microorganismo, por conferir-lhe resistência ao soro, bem como facilitar a adesão e, subsequentemente, sua internalização nos tecidos.

### 1.9 Leptospiras e vitronectina humana

Dados do grupo indicam que diversos sorovares de *Leptospira*, saprófitos e patogênicos, interagem com vitronectina (Iniciação Científica, Lídia Miragaia). Essa interação foi confirmada por metodologias distintas como *Western blotting* (Figura 13A), ELISA (dados não mostrados) e microscopia eletrônica (Figura 13B).

**Figura 13** - Ligação da vitronectina humana a diferentes espécies de *Leptospira*.



Ligação da vitronectina humana a diferentes espécies de *Leptospira*: **(A)** Leptospiras foram incubadas com 20% de soro humano normal (SHN). Após lavagens, os lisados bacterianos foram submetidos a *Western blotting* com anti-vitronectina humana. Colunas: 1 - *L. interrogans* sorovar Copenhageni; 2 - *L. interrogans* sorovar Pomona; 3 - *L. noguchi* sorovar Panamá; 4 - *L. borgpetersenii* sorovar Javanica; 5 - *L. borgpetersenii* sorovar Tarassovi; 6 - *L. kirshneri* sorovar Cynopteri; 7 - *L. santarosai* sorovar Shermani; 8 - SHN (1:100). **(B)** *L. interrogans* sorovar Kennewicki estirpe Fromm foi incubada com vitronectina humana purificada (esquerda) ou PBS (direita). Após diversas lavagens, leptospiras foram incubadas com anti-vitronectina, e com anticorpo secundário conjugado com partículas de ouro coloidal (10 nm). As bactérias foram observadas por MET.

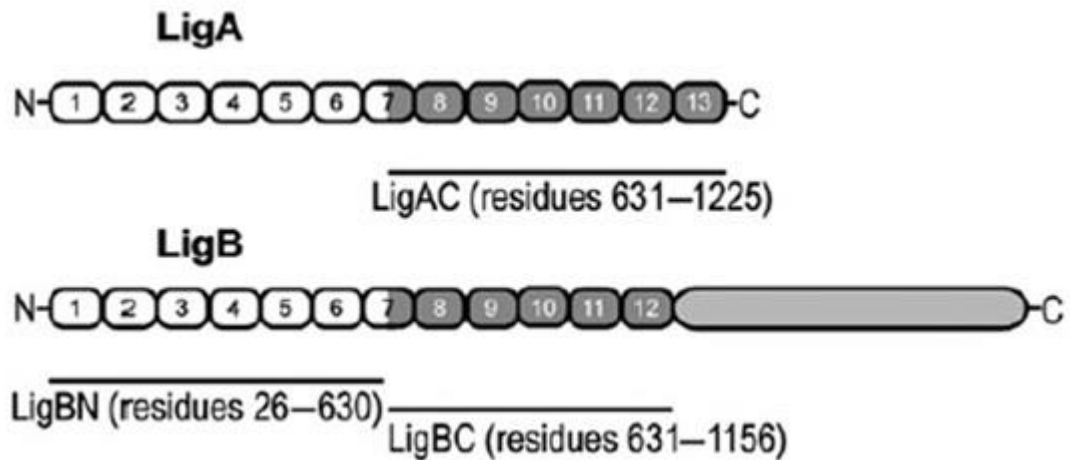
Ainda, uma análise envolvendo uma série de proteínas de membrana de leptospiras patogênicas purificadas por nosso grupo sugeriu a participação de três possíveis alvos de interação na superfície da bactéria: as proteínas LigA e LigB e a proteína LcpA (Iniciação Científica, Lídia Miragaia). No presente projeto, pretendeu-se caracterizar a natureza da interação da vitronectina com as três proteínas de membrana mencionadas, mapear os domínios das proteínas de *Leptospira* envolvidos nesta interação e realizar ensaios funcionais que permitissem avaliar a real importância destas interações para a sobrevivência da bactéria.

### 1.10 As proteínas Lig

As proteínas Lig, *Leptospira immunoglobulin-like proteins*, são proteínas de superfície com alta massa molecular e apresentam domínios *Bacterial immunoglobulin-like* (Big) repetidos em seqüência. Nos genomas de *Leptospira* foram descritos três genes pertencentes à mesma família: *ligA*, *ligB* e *ligC*. A seqüência de 630 aminoácidos presente na porção N-terminal de LigA e de LigB é idêntica, porém a porção C-terminal de ambas é variável com um grau de identidade de 34%. LigB possui um domínio C-terminal extra (PALANIAPPAN et al., 2002). O gene *ligC* é um pseudo gene na espécie que se adotou para estudo. As proteínas LigA e LigB têm sido muito estudadas. São moléculas multifuncionais, produzidas apenas por espécies patogênicas e capazes de induzir a produção de anticorpos, sendo atualmente utilizadas no diagnóstico da doença. São proteínas apontadas como excelentes candidatos vacinais para leptospirose, conferindo entre 70% a 100% de proteção em modelo animal, apesar dos animais continuarem portadores (KOIZUMI et al., 2004; MATSUNAGA et al., 2003; PALANIAPPAN et al., 2002). Elas são capazes de interagir com diversos componentes da matriz extracelular e com moléculas do sistema complemento (CASTIBLANCO-VALENCIA et al., 2012; CHOY et al., 2007; LIN et al., 2009, 2010).

Pelo fato de serem grandes, as proteínas Lig geralmente são produzidas na forma de recombinantes como: LigAC (porção C-terminal da LigA), LigBC (porção C-terminal da LigB) e LigBN (porção N-terminal da LigB comum às duas) (Figura 14).

**Figura 14** - Modelo esquemático das proteínas recombinantes Lig (LigAC, LigBC e LigBN).



Modelo esquemático das proteínas recombinantes Lig: LigAC (porção C-terminal da proteína LigA), LigBC (porção C-terminal da proteína LigB) e LigBN (porção N-terminal comum tanto a LigA quanto a LigB) (Castiblanco-Valencia et al., 2012).

### 1.11 A proteína LcpA

A proteína LcpA tem sido caracterizada por nosso grupo nesses últimos anos e parece ter importância na patogênese da bactéria por ser uma proteína envolvida no processo de evasão ao sistema complemento. Com cerca de 20 kDa, essa proteína de superfície está presente apenas nas espécies patogênicas e é codificada pela LIC11947. Foi descrita primeiramente como sendo capaz de se ligar ao C4BP purificado ou solúvel no soro. Uma vez ligado à proteína, o regulador permanece funcional agindo como co-fator de Fator I na clivagem de C4b (BARBOSA et al., 2009, 2010). Essa proteína também é capaz de se ligar ao Fator H. Da mesma forma, este regulador negativo da via alternativa retém atividade de co-fator para Fator I na clivagem de C3b (SILVA et al., 2015). Por fim, conforme já mencionado, LcpA é um possível alvo de interação com vitronectina humana, fenômeno este explorado em detalhes no presente trabalho.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar e caracterizar a interação de vitronectina, um regulador da via terminal do sistema complemento humano, com as proteínas de membrana externa LigA, LigB e LcpA de *Leptospira*.

### 2.2 Objetivos específicos

a) Expressar e purificar as proteínas recombinantes de membrana externa de *Leptospira* escolhidas para este trabalho (LigA, LigB e LcpA);

b) Mapear os sítios de interação das proteínas envolvidos nesta ligação com vitronectina;

c) Mapear os sítios de vitronectina envolvidos na interação com as proteínas recombinantes;

d) Avaliar a natureza das interações descritas acima (dependência de forças iônicas);

e) Avaliar a interação das proteínas com o componente C9, formador do poro do complexo de ataque à membrana;

f) Investigar o papel dessas proteínas *in vitro* na inibição da atividade do MAC através de ensaios de polimerização de C9 e através de ensaios hemolíticos;

g) Avaliar se há ou não competição de dois ou mais ligantes (FH, C4BP ou vitronectina) por sítios de ligação nas proteínas recombinantes de *Leptospira* (LigA, LigB e LcpA).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Soluções e reagentes utilizados

##### 3.1.1 Meios de Cultura

- Meio LB: triptona 1%, extrato de levedura 0,5% e NaCl 1%.
- Meio LB/amp: meio LB com ampicilina 100 µg/mL.
- Meio LB/Agar: triptona 1%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 1%, ágar 1,5%.  
Todos os meios foram autoclavados a 120 °C por 120 minutos.

##### 3.1.2 Soluções de Purificação de Proteínas

- PBS pH 7,4: NaCl 1,37M, KCl 0,027M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,10M e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,017M.
- Tampão de solubilização do corpúsculo: PBS pH 7,4 e uréia 8M.
- Solução de lavagem: PBS pH 7,4 e imidazol 5 mM.
- Solução de eluição: PBS pH 7,4 e imidazol (5mM, 10 mM, 20 mM, 40 mM, 60 mM, 1M).
- Tampão de diálise: PBS pH 7,4 e glicina 0,1%.

##### 3.1.3 Soluções de preparação do gel SDS-PAGE

- Acrilamida 30%: Acrilamida 29% e Bis-acrilamida 1%.
- Tampão Tris-HCl pH 8,8: Tris-HCl 1,5 M e SDS 0,1 %.
- Tampão Tris-HCl pH 6,8: Tris-HCl 1M e SDS 0,1 %.
- Persulfato de amônio 10%.
- TEMED: N,N,N',N' – tetrametiletilenodiamina.

##### 3.1.4 Soluções de eletroforese SDS-PAGE

- Tampão de aplicação 5x: Tris-HCl 50 mM pH 6,8, SDS 2%, azul de bromofenol 0,1%, glicerol 10%; β-mercaptoetanol 100 mM.
- Tampão de corrida: Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM e SDS 0,1%.
- Solução corante: ácido acético glacial 10%, etanol 50% e *Coomassie Blue Brilliant* 0,25%.



- Solução descorante: ácido acético glacial 10% e etanol 30%.
- Solução secante: ácido acético glacial 10% e etanol 50%.

### 3.1.5 Soluções de *Western blotting*

- Tampão de transferência: Tris-base 48 mM, glicina 39 mM, etanol 20% e SDS 0,037%, pH 8,3.
- PBS pH 7,4: NaCl 1,37M, KCl 0,027M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,10M e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,017M.
- PBS-T: PBS pH 7,4 e Tween 20 0,05%.
- Solução de *Ponceau*: *Ponceau S* 0,1 % em ácido glacial 10%.
- Tampão de bloqueio: PBS-T contendo 10% de leite desnatado.
- Solução de diluição de anticorpos: PBS-T contendo 5% de leite desnatado.
- Solução de revelação: SuperSignal® West Pico *Enhanced Chemiluminescent Substrate* (Pierce).

### 3.1.6 Soluções de ELISA

- PBS pH 7,4: NaCl 1,37 M, KCl 0,027 M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,10 M e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,017 M.
- Solução de lavagem: PBS pH 7,4 e Tween 20 0,05%.
- Soluções de bloqueio: PBS em 3% BSA e/ou PBS-T em 10% leite desnatado.
- Tampão citrato-fosfato: citrato 0,1M, fosfato 0,2M pH, 5,0.
- Solução de revelação: substrato *o*-fenilenodiamina (OPD) 0,05% e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em tampão citrato-fostato 30%pH 5,0.
- Solução de parada: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4N.

### 3.1.7 Soluções do ensaio de polimerização com zinco

- Tampão Tris HCl 20 mM pH 7,2.
- ZnCl<sub>2</sub> 50 µM.

### 3.1.8 Soluções para coloração por prata

- Solução fixadora: 50% metanol, 12% ácido acético e 0,05% formaldeído 37%.
- Solução álcool: etanol 30%.

- Solução tiosulfato de sódio: 0,02% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.
- Solução corante: 0,1% AgNO<sub>3</sub> e 0,075% formaldeído 37%.
- Solução reveladora: 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e 0,05% formaldeído 37%.
- Solução stop: 50% metanol e 12% ácido acético.

### 3.1.9 Soluções do ensaio hemolítico

- Tampão hemácias: *Veronal buffered saline* (VBS)

## 3.2 Proteínas purificadas, anticorpos e soro humano normal

Soro humano normal (SHN) e proteínas humanas purificadas utilizadas nesse estudo (Fator H, C4BP, C5b6, C7, C8 e C9) foram adquiridos da Complement Technology. Vitronectina humana foi adquirida da Sigma-Aldrich. Anticorpos específicos como anti-Fator H e anti-C4BP foram adquiridos da Quidel e da Calbiochem, respectivamente. Anti-vitronectina e anti-C9 foram adquiridos da Complement Technology e os anticorpos secundários da Sigma-Aldrich.

## 3.3 Expressão e purificação das proteínas recombinantes LigAC, LigBC, LigBN e LcpA

Os genes que codificam essas proteínas foram clonados por outros membros do grupo. A fim de se obter uma boa quantidade de proteínas para utilização nos ensaios, neste projeto foram realizadas a expressão e purificação dessas proteínas.

Para tanto, a linhagem *E. coli* BL21-DE3 competente foi transformada com as construções pAE/LigAC, pAE/LigBC, pAE/LigBN e pAE/LcpA. O vetor pAE permite a expressão heteróloga de proteínas adicionando uma cauda de histidina (6 x His) que é colocada logo após o códon de iniciação, na extremidade amino-terminal. A purificação da proteína recombinante ocorre através de colunas de afinidade a metal. As bactérias competentes foram mantidas no gelo por aproximadamente 15 minutos, em seguida foram adicionados 2 µL de plasmídeo (aproximadamente 500 ng) e o conteúdo da mistura foi mantido no gelo por mais 15 minutos. Após esse tempo, realizou-se um choque térmico por 50 segundos a 42 °C e então os tubos foram colocados novamente no gelo por dois minutos. A essa mistura foram adicionados 350 µL de meio LB previamente aquecido. Procedeu-se a uma

incubação a 37 °C sob agitação por 1 hora. Essa cultura foi plaqueada em meio LB-ágar contendo ampicilina (100 µg/µL) e incubada a 37 °C por 16 horas. As colônias isoladas das transformações contendo as construções plasmidiais foram inoculadas em 50 mL de meio LB com ampicilina e incubadas a 37 °C sob agitação por 16 horas. Esse pré-inóculo foi adicionado a 400 mL de meio LB com ampicilina e a cultura foi incubada a 37 °C sob agitação até atingir a DO<sub>600 nm</sub> de 0,6 a 0,8. Adicionou-se IPTG 1 mM e incubou-se por mais quatro horas a 37 °C sob agitação de 250 rpm. Após o período de indução, a cultura foi centrifugada a 2057 x g por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento bacteriano ressuscitado em 30 mL de PBS. Realizou-se a lise através da passagem pelo *French Pressure Cell Press* (SLM Amico) e a suspensão da lise foi centrifugada a 12.857 x g por 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante (fração solúvel) foi coletado e o sedimento (fração insolúvel) foi ressuscitado em tampão de solubilização (uréia 8M). As amostras da fração solúvel e insolúvel foram analisadas em gel de eletroforese SDS-PAGE para continuação do processo de purificação.

As proteínas foram expressas na forma insolúvel (corpúsculos de inclusão), sendo necessária então uma etapa de renaturação. Os corpúsculos foram solubilizados em 50 mL de uréia 8 M dissolvida em PBS pH 7,4, e a solução gotejada em dois litros de PBS pH 7,4 contendo imidazol 5 mM sob agitação lenta. Essa solução foi purificada por cromatografia de afinidade metálica, com resina de Sepharose (*Fast Flow Chelating Sepharose*, GE Healthcare) previamente carregada com sulfato de níquel, uma vez que as proteínas recombinantes possuem seis resíduos de histidina em suas porções amino-terminais. A eluição foi feita com tampão contendo imidazol (5 mM, 10 mM, 20 mM, 40 mM, 60 mM, 1 M). Por fim, foram ainda realizadas diálises em PBS pH 7,4 por 24 - 48h contendo glicina 0,1% a 4 °C. As proteínas purificadas foram analisadas por SDS-PAGE.

As eletroforeses foram realizadas seguindo o protocolo descrito por Sambrook et al., (1989) sob amperagem fixa (25 mA por gel). Os géis utilizados continham 5% de bisacrilamida/acrilamida no gel de empilhamento e 12 ou 15% de bisacrilamida/acrilamida no gel de separação. As amostras foram preparadas em tampão de aplicação (5 X) e desnaturadas a 96 °C por três minutos. Para acompanhamento foi utilizado um padrão de massa molecular conhecido

(PageRuler). Após a eletroforese, os géis foram corados com *Comassie Blue* por 1 hora sob agitação e descorados com solução descorante.

### **3.4 Mapeamento dos domínios das proteínas Lig e LcpA envolvidos na interação com vitronectina**

Fragmentos correspondentes às porções N-terminal e C-terminal das proteínas LigA e LigB purificados conforme descrito anteriormente e três fragmentos correspondentes às porções N-terminal, intermediária e C-terminal da proteína LcpA (previamente purificados por nosso grupo) foram utilizados em ensaios de *Western blotting* com sobreposição para fins de mapeamento das regiões dessas moléculas envolvidas na interação com vitronectina. As proteínas recombinantes purificadas foram submetidas à eletroforese SDS-PAGE conforme descrito anteriormente e transferidas para membranas de nitrocelulose em sistema úmido e amperagem fixa (350 mA) por 1 hora. Após a transferência, os sítios de ligação inespecíficos foram bloqueados com 10% de leite em pó desnatado diluído em PBS-Tween 0,05% pH 7,4 (PBS-T) por 16 horas. Posteriormente, essas membranas foram lavadas três vezes por cinco minutos com PBS-T, e incubadas com 20% de SHN como fonte de vitronectina por 1 hora e meia sob agitação leve em temperatura ambiente. Após a incubação, foram realizadas cinco lavagens com PBS-T e as membranas foram incubadas com anti-vitronectina produzido em coelho (1:5.000) diluído em PBS-T contendo 5% de leite em pó desnatado, em temperatura ambiente por mais 1 hora sob agitação leve. Após mais três lavagens com PBS-T, as membranas foram incubadas com anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (1:10.000) diluído em PBS-T contendo 5% de leite em pó desnatado por mais 1 hora. Após mais três lavagens, a revelação dessas membranas foi realizada com *SuperSignal® West Pico Enhanced Chemiluminescent Substrate* (ECL) segundo instruções do fabricante.

### **3.5 Mapeamento dos sítios de vitronectina envolvidos na interação com as proteínas recombinantes**

Como a vitronectina possui diferentes domínios funcionais envolvidos em diferentes processos (Figura 12), avaliamos se a interação desta molécula com as proteínas recombinantes de *Leptospira* envolveria alguns desses domínios. Foram

realizados ensaios de competição com os seguintes compostos: heparina e PAI-1. As proteínas recombinantes foram imobilizadas em poços de placas de ELISA (1 µg/poço) diluídas em PBS pH 7,4 por 16 horas a 4 °C. Após a incubação, foram realizadas três lavagens com 200µL de PBS-Tween 0,05% e os poços foram bloqueados com 200 µL de BSA (3%) diluído em PBS pH 7,4 por 2 horas a 37 °C. Após o bloqueio, mais três lavagens foram realizadas e foram adicionadas vitronectina (10 µg/mL) e quantidades crescentes de heparina (0,1 – 20 µg/mL) ou PAI-1 (1,25 – 10 µg/mL) por 1 hora a 37 °C, conforme protocolo descrito por Singh et al., 2010. Os poços foram lavados novamente e a detecção da vitronectina ligada às proteínas imobilizadas foi feita com anti-vitronectina produzido em coelho diluído em PBS (1:5000) por 1 hora a 37 °C. Após três lavagens adicionou-se anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase diluído em PBS (1:10.000) por mais 1 hora a 37°C. Após mais três lavagens, a revelação foi feita com solução de OPD (*o*-fenilenodiamina) diluída em tampão citrato-fosfato com 30% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Após 10 minutos, a reação foi interrompida pela adição de 50 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4 N. A leitura foi feita em um leitor de microplacas na absorvância de 492 nm.

### **3.6 Avaliação do papel de forças iônicas nas interações das proteínas Lig e LcpA com vitronectina humana**

O papel de forças iônicas na interação da vitronectina com as proteínas recombinantes foi avaliado mediante co-incubação com quantidades crescentes de NaCl. As proteínas recombinantes foram imobilizadas em poços de placas de ELISA (1 µg/poço) diluídas em PBS pH 7,4 por 16 horas a 4 °C. Após a incubação, foram realizadas três lavagens com 200 µL de PBS-Tween 0,05% e os poços foram bloqueados com 200 µL de BSA (3%) diluído em PBS pH 7,4 por 2 horas a 37 °C. Após o bloqueio, mais três lavagens foram realizadas e foram adicionadas vitronectina (10 µg/mL) e quantidades crescentes de NaCl (10 – 500 mM) por 1 hora a 37 °C. A detecção da vitronectina ligada às proteínas imobilizadas na presença de sal foi feita conforme descrito no item anterior.

### **3.7 Interação das proteínas Lig e LcpA com o componente C9**

A ligação do componente da via terminal C9 às proteínas recombinantes foi avaliada por ELISA. Poços de placas de ELISA foram revestidos com as proteínas recombinantes LigA, LigB, LcpA, vitronectina (controle positivo), LIC10301 (proteína de membrana externa de *Leptospira* usada como controle negativo) e BSA (controle negativo) (1 µg/poço), diluídas em PBS pH 7,4 por 16 horas a 4 °C. Posteriormente, os poços foram lavados com PBS-T pH 7,4 e os sítios inespecíficos foram bloqueados com BSA 3% diluído em PBS-T pH 7,4 por 2 horas. Após mais três lavagens, o componente C9 (1 µg) foi adicionado e incubou-se por 60 minutos a 37 °C. Após lavagens, a ligação foi detectada com anti-C9 humano produzido em cabra diluído em PBS (1:5.000). Após mais três lavagens, adicionou-se anti-IgG de cabra diluído em PBS (1:10.000) conjugado a peroxidase. A revelação foi feita conforme descrito no item 3.5.

### **3.8 Ensaios de inibição da polimerização de C9 na presença de diferentes concentrações das proteínas recombinantes**

Os ensaios de inibição da polimerização de C9 foram realizados de acordo com protocolo publicado por Zhang et al., 2011. As proteínas recombinantes LcpA, LigA, LigB (1,25 µg a 5 µg) e a proteína LIC10301 (5 µg), usada como controle negativo, foram pré-incubadas com 3 µg de C9 a 37 °C em tampão contendo Tris-HCl 20 mM pH 7,2. Após 40 minutos de incubação, 50 µM de ZnCl<sub>2</sub> foram adicionados e incubou-se por mais 2 horas a 37 °C. Às amostras foi adicionado tampão SDS 5X sem β-mercaptoetanol (condições não-desnaturantes). A separação foi feita usando-se um gel de gradiente (8 a 16%) (Bio-Rad). Monômeros e polímeros de C9 foram visualizados mediante coloração do gel por prata.

### **3.9 Ensaios hemolíticos**

A atividade inibitória das proteínas recombinantes sobre a formação do MAC foi analisada por ensaio hemolítico utilizando hemácias de carneiro. Os eritrócitos foram ressuspendidos ( $4 \times 10^8$  células/mL) em tampão Veronal (VBS) e pré-incubados com 4 µg/mL de C5b6 por 1 hora a temperatura ambiente sob leve agitação. Em uma preparação separada, 4 µg/mL de C9 foram pré-incubados com concentrações

crecentes de cada proteína recombinante purificada (6,25 a 50 µg/mL) por 30 minutos a 37 °C. Como controles da reação foram utilizados uma proteína de membrana externa de *Leptospira* LIC10301 (50 µg/mL) e Fator H (50 µg/mL). Nesse ensaio também avaliou-se a eventual atividade inibitória das três proteínas de *Leptospira* que interagem com C9 combinadas (LcpA, LigA e LigB 25 µg/mL cada). Posteriormente, os componentes C7 (4 µg/mL) e C8 (0,4 µg/mL) foram adicionados à mistura por 15 minutos a 37°C. Após a pré-incubação, eritrócitos com C5b6 foram adicionados à mistura contendo as proteínas-C789 e incubados por 30 minutos a 37 °C. Os eritrócitos foram centrifugados e a quantidade de hemoglobina liberada representa a quantidade de células lisadas, estimada por leitura a 540 nm.

### **3.10 Ensaio de competição**

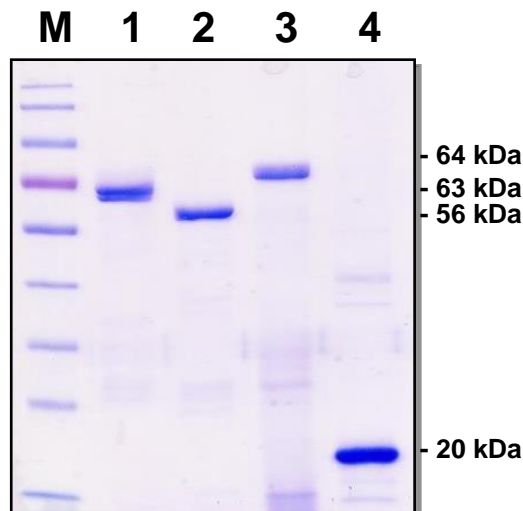
Trabalhos anteriores mostraram que tanto as proteínas Lig quanto a proteína LcpA interagem com outros reguladores do sistema complemento como Fator H e C4BP (BARBOSA et al., 2010; CASTIBLANCO-VALENCIA et al., 2012; SILVA et al., 2015). Foram então realizados ensaios para avaliar se haveria competição entre os diversos reguladores por ligação nas proteínas-alvo. As proteínas recombinantes (1 µg/poço) foram imobilizadas em poços de placas de ELISA por 16 horas a 4 °C e após três lavagens com PBS-T, os sítios inespecíficos foram bloqueados com BSA 3% diluído em PBS-T por 2 horas a 37 °C. Foi realizada uma co-incubação, fixando-se a concentração de um dos ligantes (10 µg/mL) e aumentando-se a concentração do outro (FH 2,5 - 40 µg/mL, C4BP 0,625 - 10 µg/mL) por 1 hora a 37 °C. Os ensaios foram realizados em duplicata para que pudessem ser utilizados dois anticorpos, anti-FH produzido em cabra (1:5.000), anti-C4BP produzido em camundongo (1:2.000) ou anti-vitronectina produzido em coelho (1:500), a cada vez, seguido dos anticorpos secundários específicos conjugados a peroxidase (anti-cabra e anti-coelho 1:10.000 e anti-camundongo 1:5.000). A revelação foi feita conforme descrito previamente no item 3.5.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Expressão e purificação das proteínas recombinantes LigAC, LigBC, LigBN e LcpA

As proteínas LcpA, LigAC (porção C-terminal da proteína LigA), LigBC (porção C-terminal da proteína LigB) e LigBN (porção N-terminal idêntica, comum às proteínas LigA e LigB) foram expressas na fração insolúvel e, portanto, foi necessária a realização de uma etapa de renaturação. Após eluição, as frações contendo proteínas foram reunidas e dialisadas contra PBS por 24-48h. Após a diálise as proteínas purificadas foram analisadas em SDS-PAGE (Figura 15) onde podemos observar bandas de 63 kDa, 56 kDa, 64 kDa e 20 kDa correspondentes às proteínas LigAC, LigBC, LigBN e LcpA, respectivamente.

**Figura 15** - SDS-PAGE (15%) corado por *Comassie Blue Brilliant R-250*.



Colunas do gel de poliacrilamida corado com *Comassie Blue Brilliant*: (M) marcador PageRuller, (1) LigAC 63 kDa, (2) LigBC 56 kDa, (3) LigBN 64 kDa e (4) LcpA 20 kDa.

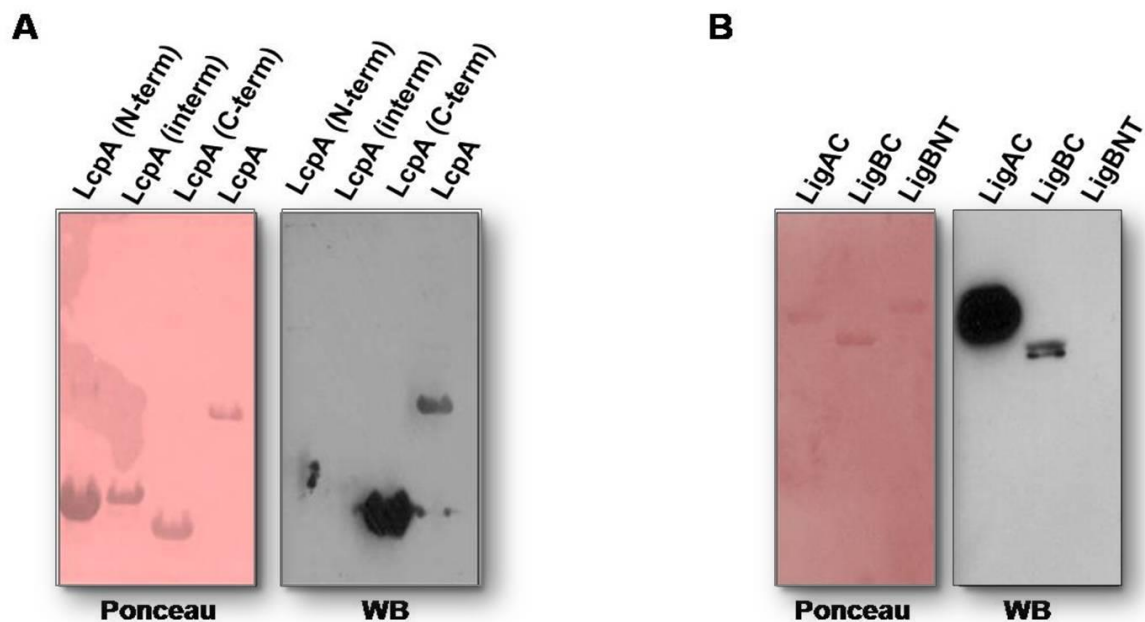
### 4.2 Mapeamento das regiões das proteínas recombinantes LcpA, LigA e LigB envolvidas na interação com vitronectina

Como citado anteriormente, nosso grupo mostrou que a proteína LcpA liga-se ao regulador do sistema complemento humano *C4b Binding Protein* (C4BP) (BARBOSA et al., 2010). Três fragmentos recombinantes correspondentes às regiões amino-terminal, central e carboxi-terminal da referida proteína foram produzidos com o objetivo de mapear o domínio de interação com C4BP. Neste trabalho, utilizamos esses mesmos fragmentos para mapear as regiões envolvidas



na interação com vitronectina humana. Os resultados de *Western blotting* com sobreposição (Far-WB) utilizando-se soro humano normal (SHN) como fonte de vitronectina mostraram que a porção C-terminal da proteína LcpA é responsável pela interação com vitronectina (Figura 16A). Da mesma forma, mapeamos os domínios de interação das proteínas Lig com esta molécula. Podemos observar que a vitronectina interage fortemente com o domínio C-terminal da LigA, mais fracamente com o domínio C-terminal da LigB, mas não com o domínio comum a elas, N-terminal (LigBN) (Figura 16B).

**Figura 16** - Mapeamento dos domínios de interação das proteínas LcpA.



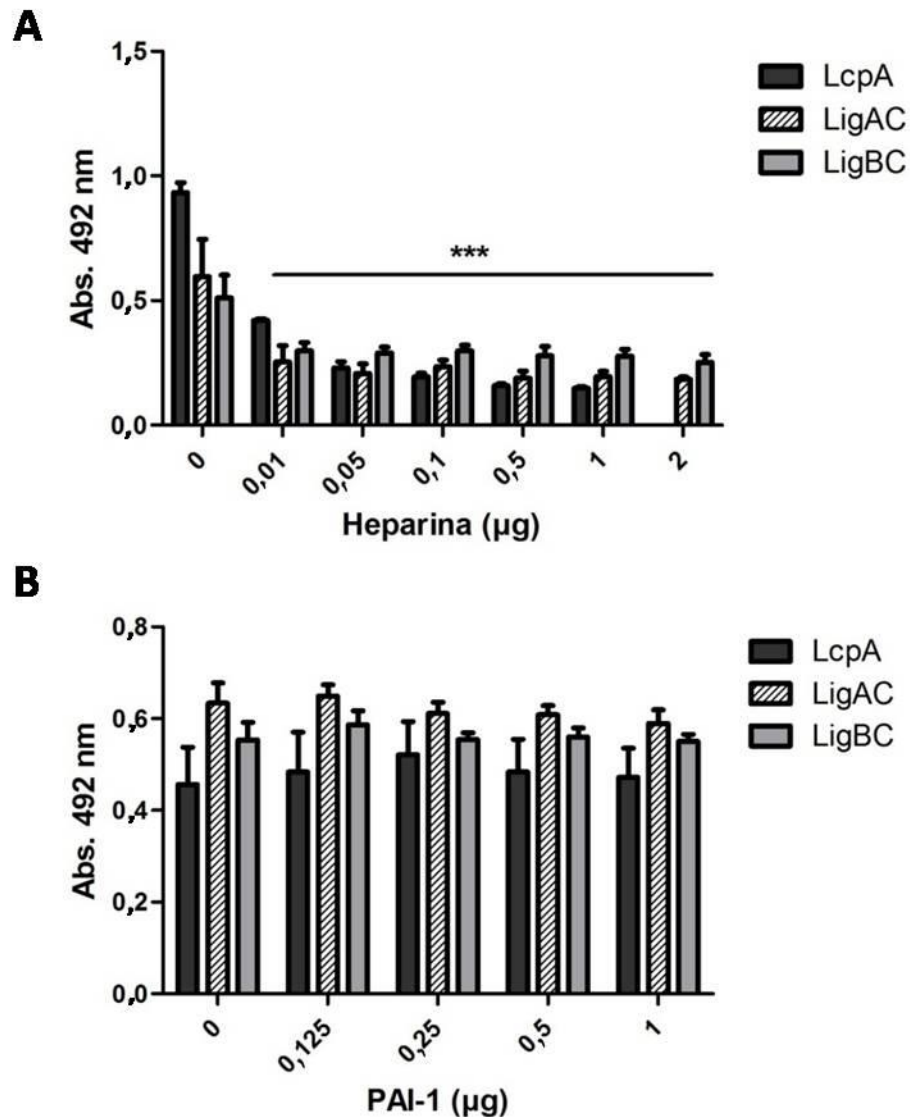
Mapeamento dos domínios de interação das proteínas LcpA: **(A)**, LigA e Lig B **(B)** com vitronectina humana. As membranas foram incubadas com SHN (20%), lavadas e incubadas com anti-vitronectina produzida em coelho (1:5.000) e anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase (1:10.000). Membranas de nitrocelulose coradas com *Ponceau* (esquerda) e *Western blotting* com sobreposição (direita). LcpA (N-term) - 10,04 kDa; LcpA (Interm) - 9,95 kDa; LcpA C-term - 9,58 kDa; LcpA - 20 kDa; LigAC 63 kDa; LigBC 56 kDa; LigBN 64 kDa.

#### 4.3 Mapeamento dos sítios de vitronectina envolvidos na interação com as proteínas recombinantes LcpA, LigA e LigB

A vitronectina possui três domínios de ligação à heparina e um ao inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 (PAI-1) (Figura 12). Como diversos patógenos interagem com esta molécula utilizando esses sítios, avaliamos se eles seriam os responsáveis pela interação das proteínas com vitronectina. Pode-se observar que tanto com a LcpA quanto com as proteínas Lig ocorre uma inibição de forma dose-

dependente na presença de heparina, mas não com o PAI-1. Estes resultados indicam que LcpA, LigAC e LigBC interagem com vitronectina através dos seus domínios de ligação à heparina.

**Figura 17** - Interação de LcpA, LigAC e LigBC com vitronectina na presença de heparina.

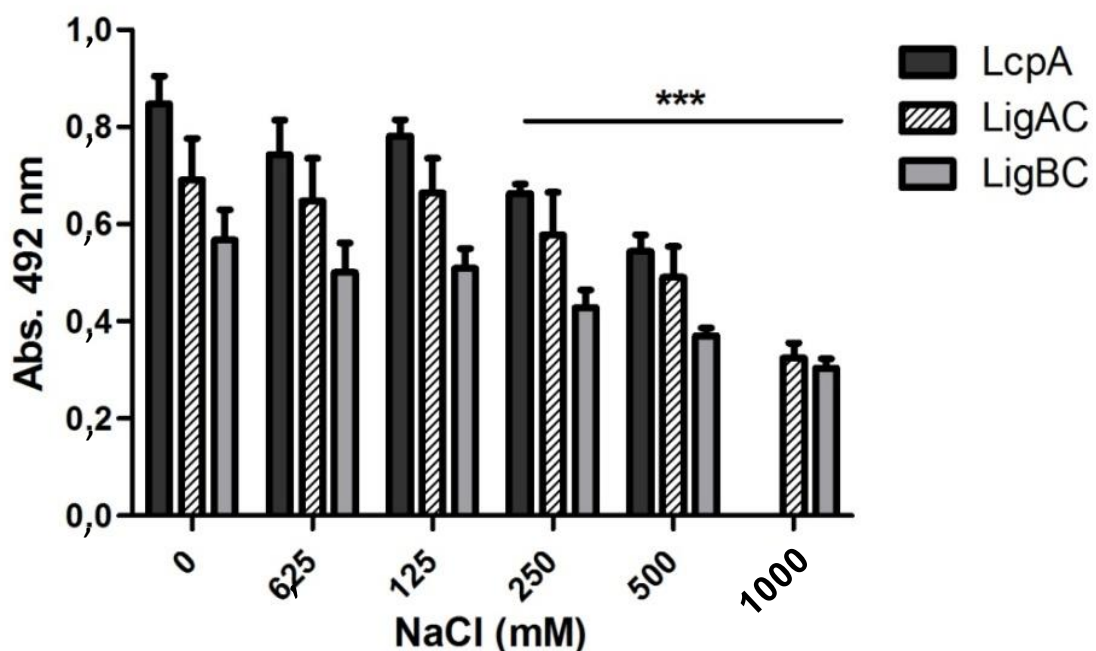


Interação de LcpA, LigAC e LigBC com vitronectina na presença de heparina **(A)** ou de PAI-1 **(B)**. As proteínas recombinantes foram imobilizadas em poços de placas de ELISA (1µg/poço). Após o bloqueio, foram adicionadas vitronectina e quantidades crescentes de heparina (0,1 - 10 ug/mL) ou PAI-1 (1,25 - 10 ug/mL). A detecção da vitronectina ligada às proteínas imobilizadas foi feita com anticorpos específicos e a revelação foi feita com solução de OPD. Cada barra representa o valor médio de absorbância a 492 nm de três experimentos independentes, cada um realizado em triplicata. \*\*\*,  $P \leq 0,001$ . As análises estatísticas foram realizadas utilizando ANOVA.

#### 4.4 Avaliação do papel das forças iônicas na interação das proteínas LcpA, LigA e LigB com vitronectina humana

No que diz respeito ao papel de forças iônicas, o efeito de NaCl (62,5 a 500 mM) na ligação da vitronectina (10 µg/mL) às proteínas imobilizadas (10 µg/ml) também foi avaliado. NaCl na faixa de 250 - 500 mM inibiu parcialmente a ligação de LcpA à vitronectina e de 250 – 1000 mM inibiu parcialmente a ligação das proteínas Lig a esta molécula (Figura 18). Os dados sugerem que forças iônicas desempenham um papel nestas ligações.

**Figura 18** - Avaliação do papel das forças iônicas na interação de LcpA, LigAC e LigBC com vitronectina.



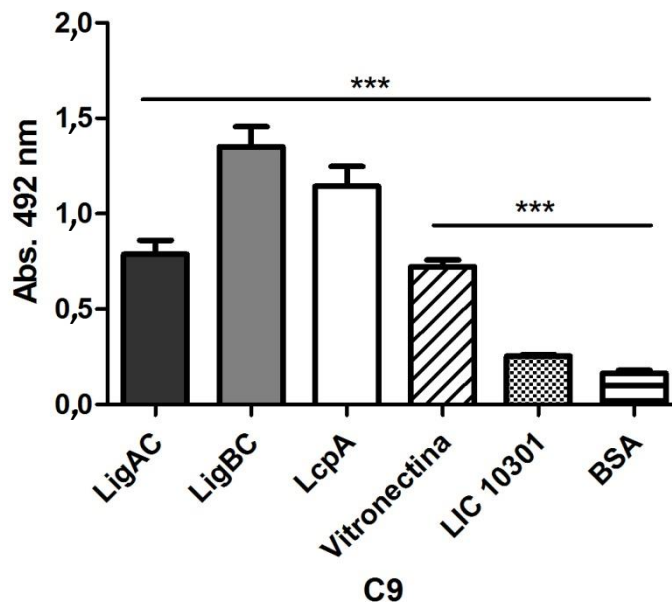
As proteínas recombinantes foram imobilizadas em poços de placas de ELISA (1µg/poço). Após o bloqueio, foram adicionadas vitronectina e quantidades crescentes de NaCl (10 – 500 mM). A detecção da vitronectina ligada às proteínas imobilizadas na presença de sal foi feita com anticorpos específicos e a revelação foi feita com solução de OPD. Cada barra representa o valor médio de absorvância a 492 nm de três experimentos independentes, cada um realizado em triplicata. \*\*\*,  $P \leq 0,001$ . As análises estatísticas foram realizadas utilizando ANOVA.

#### 4.5 Interação das proteínas recombinantes LcpA, LigA e LigB com o componente C9

Dados da literatura revelam que muitas proteínas que interagem com vitronectina também podem se ligar a C9, a proteína do complemento responsável

pela formação do poro que constitui o complexo de ataque à membrana (MAC). Portanto, avaliou-se a capacidade das proteínas Lig e da proteína LcpA de se ligarem a essa molécula. As proteínas recombinantes previamente imobilizadas foram incubadas com o componente C9 purificado. Após lavagens, C9 ligado foi detectado com anticorpo específico, seguido de um secundário conjugado a peroxidase. Tanto a LcpA quanto as proteínas Lig interagiram de forma significativa com C9. A vitronectina foi incluída como controle positivo. Como controles negativos foram utilizadas a proteína de membrana de *Leptospira* LIC10301 e BSA. Ambas não interagiram de forma significativa com o componente C9 (Figura 19).

**Figura 19** - Interação de proteínas com o componente C9.



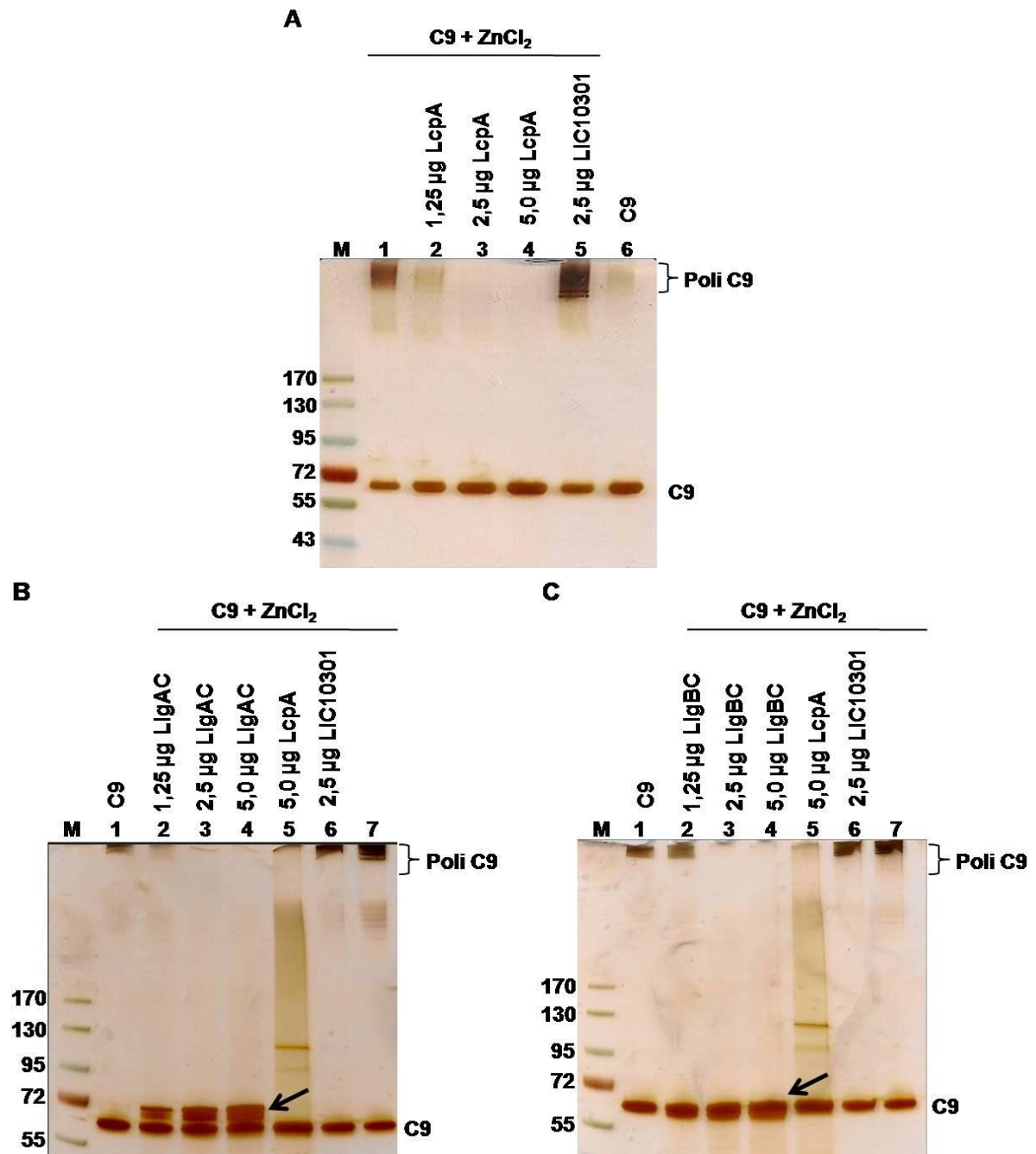
Os poços de placas de ELISA foram imobilizados (1µg/poço) com as proteínas recombinantes LigA, LigB, LcpA, vitronectina (controle positivo), LIC10301(controle negativo) e BSA (controle negativo). Após o bloqueio, o componente C9 (1µg) foi adicionado e a ligação foi detectada com anti-C9 humano e anti-IgG conjugado a peroxidase. A revelação foi feita com solução de OPD. Cada barra representa o valor médio de absorvância a 492 nm de três experimentos independentes, cada um realizado em triplicata. \*\*\*  $P \leq 0,001$ . As análises estatísticas foram realizadas utilizando ANOVA.

#### 4.6 Ensaios de inibição da polimerização de C9 na presença de LcpA, LigA e LigB

Uma vez que as proteínas recombinantes desse estudo também se ligam a C9, decidiu-se avaliar as consequências funcionais desta interação, como, por exemplo, a inibição da formação do poro que constitui o MAC, que resulta da polimerização de 12 -16 moléculas de C9. LcpA, LigA, LigB ou LIC10301 (como controle negativo)

foram previamente incubadas com C9, a 37 °C durante 40 minutos e a polimerização foi induzida por cloreto de zinco por 2 horas a 37 °C. As amostras foram sujeitas a SDS-PAGE em um gel de gradiente e a polimerização de C9 foi visualizada por coloração com prata. Na presença de 2,5 µg de LcpA (Figura 20A), de LigA (Figura 20B) e de LigB (Figura 20C), a polimerização foi completamente inibida. A proteína LIC10301 não afetou a formação do polímero de C9, como esperado.

**Figura 20** - Inibição da polimerização de C9 por LcpA, LigA e LigB.



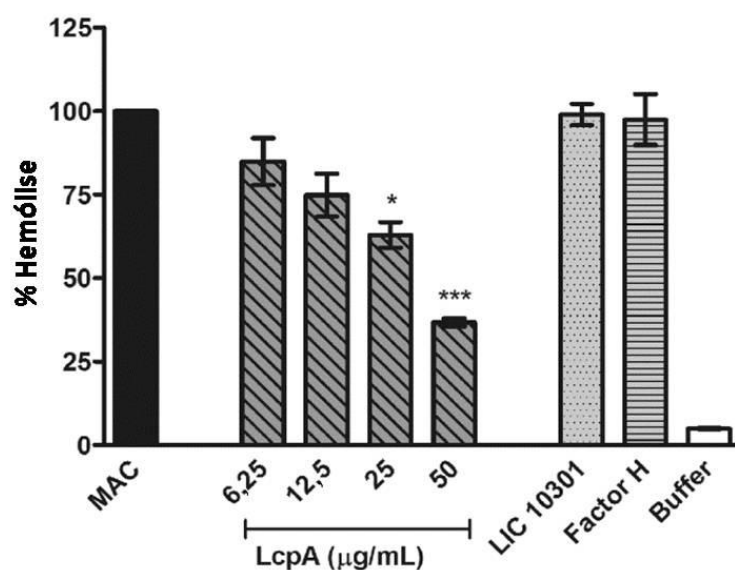
C9 foi incubada com LcpA (A), LigA (B) ou LigB (C) na presença de ZnCl<sub>2</sub>. Os produtos de incubação foram separados em géis de gradiente (8-20%) e os polímeros/monômeros de C9 foram visualizados

por coloração dos géis com prata. As setas indicam a migração das proteínas LigA e LigB, respectivamente, em seus tamanhos esperados. Como controle positivo da reação foi utilizada a molécula de C9 na presença de  $ZnCl_2$  e como controle negativo uma proteína de *Leptospira* que não se liga a essa molécula (LIC10301).

#### 4.7 Inibição da formação do MAC por LcpA, LigA e LigB utilizando um ensaio hemolítico

A capacidade das proteínas de inibir a formação do MAC também foi avaliada utilizando os componentes purificados da via terminal do complemento em um ensaio clássico de hemólise. As proteínas LcpA, LigA e LigB em diferentes concentrações foram pré-incubadas com C9, e em seguida, com C7 e C8. Essa mistura proteína-C789 foi adicionada a eritrócitos de carneiro previamente incubados com C5b6. Tanto a proteína LcpA, quanto as proteínas LigA e LigB inibiram significativamente a lise dos eritrócitos de modo dose-dependente a partir de 25  $\mu\text{g/mL}$ . Como controle da reação (MAC) foram utilizadas hemácias incubadas apenas com as proteínas formadoras do poro. LIC10301 e FH, incluídos como controles negativos, não bloquearam a atividade citolítica do MAC (Figuras 21 e 22). A lise na ausência de inibidor (MAC) foi definida como 100%. As três proteínas incubadas conjuntamente não potencializaram o efeito inibitório (25  $\mu\text{g/mL}$  cada proteína) (Figura 22).

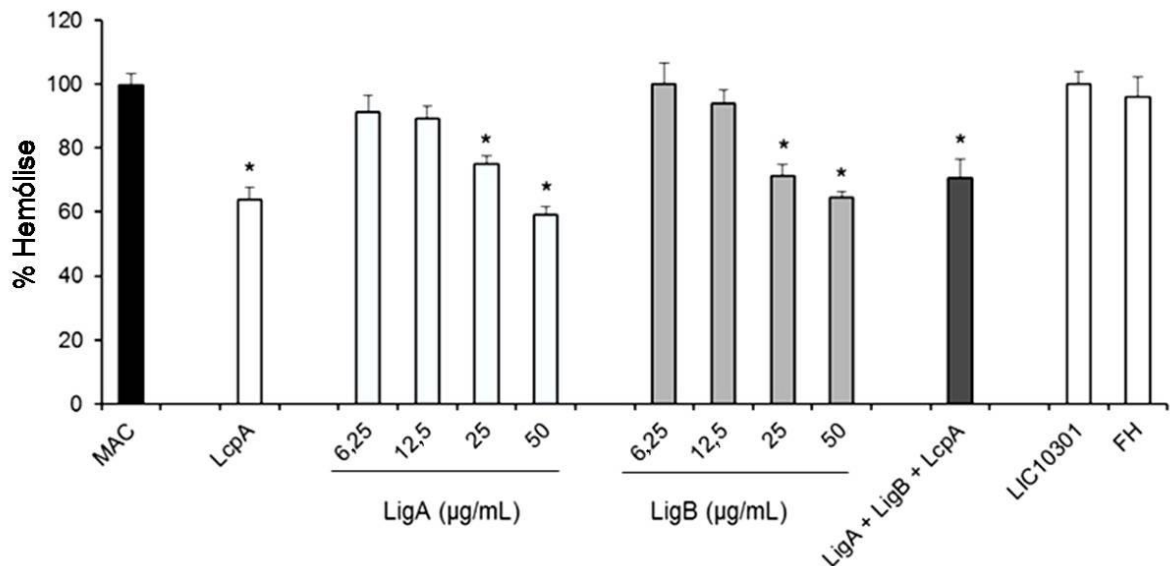
**Figura 21** - Ensaio de hemólise com a proteína LcpA.



A atividade inibitória da proteína recombinante LcpA sobre a formação do MAC foi analisada por ensaio hemolítico utilizando hemácias de carneiro. Os eritrócitos ressuspensos em tampão VBS

foram pré-incubadas com C5b6. Paralelamente moléculas de C9 foram pré-incubadas com concentrações crescentes de cada proteína recombinante purificada (6,25 a 50 µg/mL). Como controles da reação foram utilizadas uma proteína de membrana externa de *Leptospira* LIC10301 (50µg/mL) e Fator H (50 µg/mL). Posteriormente, os componentes C7 e C8 foram adicionados. Após a pré-incubação, eritrócitos com C5b6 foram adicionados à mistura contendo as proteínas-C789 e a quantidade de hemoglobina liberada representa a quantidade de células lisadas, estimada por leitura a 540 nm. \*,  $P \leq 0,05$ ; \*\*\*,  $P \leq 0,001$ . As análises estatísticas foram realizadas utilizando ANOVA.

**Figura 22** - Ensaio de hemólise com as proteínas LigA e LigB.



A atividade inibitória das proteínas recombinantes sobre a formação do MAC foi analisada por ensaio hemolítico utilizando hemácias de carneiro. Os eritrócitos ressuspensos em tampão VBS foram pré-incubados com C5b6. Paralelamente moléculas de C9 foram pré-incubadas com concentrações crescentes de cada proteína recombinante purificada (6,25 a 50 µg/mL) ou com as três proteínas (25 µg/mL cada). Como controles da reação foram utilizados uma proteína de membrana externa de *Leptospira* LIC10301 (50µg/mL) e Fator H (50 µg/mL). Posteriormente, os componentes C7 e C8 foram adicionados. Após a pré-incubação, eritrócitos com C5b6 foram adicionados à mistura contendo as proteínas-C789 e a quantidade de hemoglobina liberada representa a quantidade de células lisadas, estimada por leitura a 540 nm. \*,  $P \leq 0,001$ . As análises estatísticas foram realizadas utilizando ANOVA.

#### 4.8 Ensaios de competição

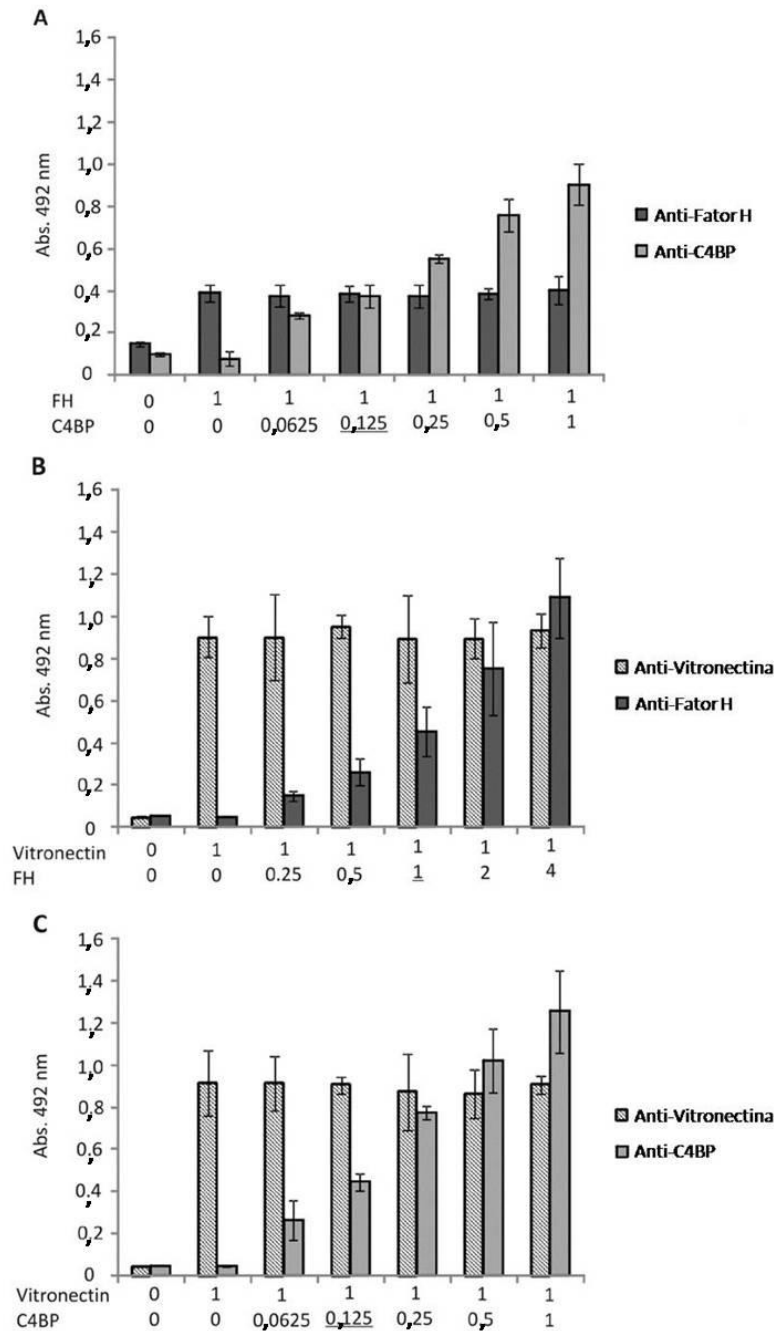
Como as proteínas recombinantes deste trabalho interagem com três reguladores do complemento distintos (C4BP, FH e vitronectina), analisou-se a eventual competição destes reguladores por sítios de interação com as proteínas.

Primeiramente a proteína recombinante LcpA foi imobilizada em poços de placas de ELISA e os ensaios de competição foram realizados incubando-se uma quantidade fixa de um determinado regulador do complemento na presença de quantidades crescentes de um segundo regulador, resultando em razões molares diferentes. Duas placas idênticas foram preparadas a fim de que pudessem ser

reveladas por dois anticorpos distintos. As proteínas aderidas foram detectadas com anti-FH ou anti-C4BP (Figura 23A), anti-FH ou anti-vitronectina (Figura 23B), e anti-C4BP ou anti-vitronectina (Figura 23C). Em todos os casos, não se observou competição entre os reguladores para ligação à LcpA, mesmo em proporções molares diferentes daquelas observadas em condições fisiológicas. Tomados em conjunto, nossos resultados indicam que FH, C4BP e vitronectina interagem com LcpA simultaneamente, através de sítios distintos.



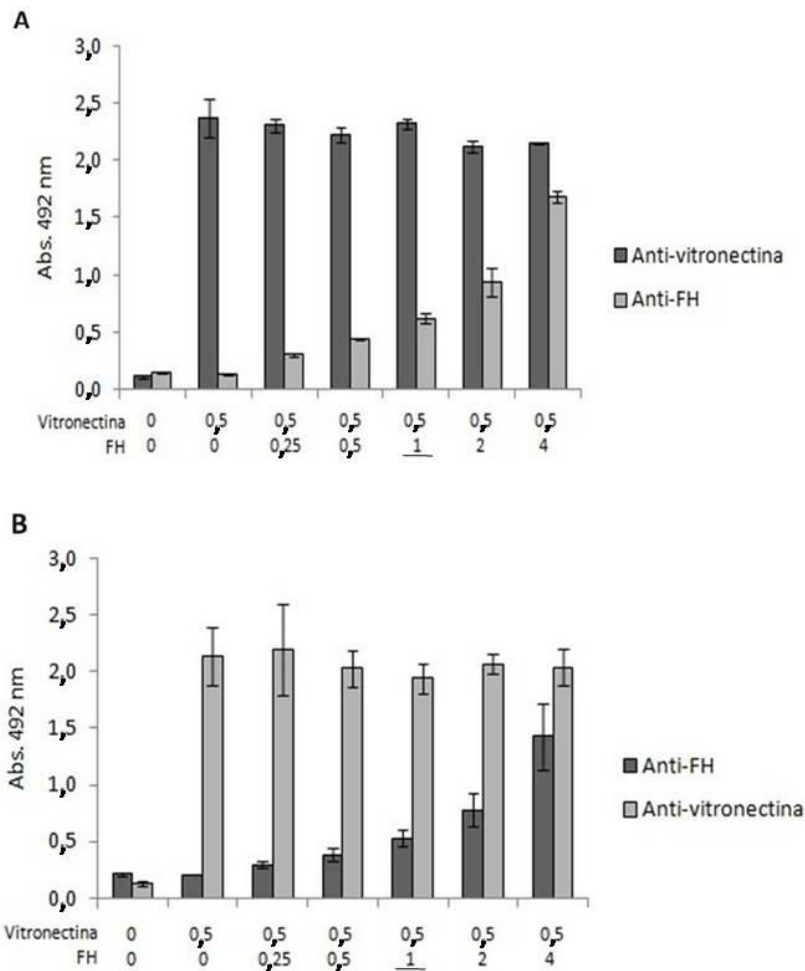
**Figura 23** - FH, C4BP, e vitronectina têm sítios de ligação distintos na LcpA.



FH, C4BP, e vitronectina têm sítios de ligação distintos na LcpA. **(A)** Ensaio de competição entre Fator H e C4BP. **(B)** Ensaio de competição entre Fator H e vitronectina. **(C)** Ensaio de competição entre C4BP e vitronectina. As proteínas recombinantes (1 µg/poço) foram imobilizadas em poços de placas de ELISA e os sítios inespecíficos foram bloqueados com BSA 3%. Foi realizada uma co-incubação, fixando-se a concentração de um dos ligantes (10 µg/mL) e aumentando-se a concentração do outro. Os ensaios foram realizados em duplicata para que pudessem ser utilizados dois anticorpos a cada vez, seguido dos anticorpos secundários específicos conjugados a peroxidase. A revelação foi feita com solução de OPD. Os dados representam a média de três experimentos independentes, cada um realizado em triplicata. Razões molares encontradas em condições fisiológicas estão sublinhadas.

Os ensaios de competição também foram realizados com LigA e LigB. Em ambos os casos, não se observou competição entre Fator H e vitronectina (Figura 24A e B). Como não dispúnhamos de anti-C4BP para completar os ensaios com as proteínas Lig, não se sabe se este regulador competiria com os demais por sítios de interação com estas proteínas de *Leptospira*.

**Figura 24** - FH e vitronectina têm sítios de ligação distintos nas proteínas Lig.



FH e vitronectina têm sítios de ligação distintos nas proteínas Lig. **(A)** Ensaio de competição entre Fator H e vitronectina como proteína LigA. **(B)** Ensaio de competição entre Fator H e vitronectina com a proteína LigB. As proteínas recombinantes (1 µg/poço) foram imobilizadas em poços de placas de ELISA e os sítios inespecíficos foram bloqueados com BSA 3%. Foi realizada uma co-incubação, fixando-se a concentração de um dos ligantes (10 µg/mL) e aumentando-se a concentração do outro. Os ensaios foram realizados em duplicata para que pudessem ser utilizados dois anticorpos a cada vez, seguido dos anticorpos secundários específicos conjugados a peroxidase. A revelação foi feita com solução de OPD. Os dados representam a média de três experimentos independentes, cada um realizado em triplicata. Razões molares encontradas em condições fisiológicas estão sublinhadas.

## 5 DISCUSSÃO

A colonização bem sucedida do hospedeiro por microrganismos patogênicos pode ser atribuída à capacidade que possuem de escapar do sistema complemento, comprometendo, assim, a primeira linha de defesa do hospedeiro. O controle da ativação do sistema complemento na superfície de um patógeno é realizado pela interação de proteínas expostas na superfície com moléculas reguladoras deste sistema, através da expressão de proteínas associadas a membranas que podem modular e/ou inibir a ativação do complemento, tais como o CD59, ou pela secreção de proteases capazes de degradar as moléculas chave do complemento em fragmentos não funcionais (PAUSA et al., 2003). Outro pré-requisito para a colonização do hospedeiro é a expressão de múltiplas adesinas de superfície, permitindo a ligação de um determinado agente patogênico a componentes de matriz extracelular e a células do hospedeiro, bem como a infecção de nichos distintos.

Cepas patogênicas de *Leptospira* ligam-se a proteínas reguladoras solúveis do complemento, como FH, FHL-1, FHR-1 e C4BP (BARBOSA et al., 2009; CASTIBLANCO-VALENCIA et al., 2012; MERI et al., 2005; VERMA et al., 2006) e também a várias moléculas da matriz extracelular e do plasma, incluindo laminina, colágeno, fibronectina, elastina, tropoelastina, proteoglicanos, fibrinogênio e plasminogênio (BARBOSA et al., 2006; BREINER et al., 2009; CHOY et al., 2007; DOMINGOS et al., 2015; LIN et al., 2007, 2008, 2009, 2010, 2011; OLIVEIRA et al., 2014; SOUZA, et al., 2012). Neste trabalho demonstramos que esta espiroqueta também interage com vitronectina humana por intermédio de proteínas expostas na superfície.

A vitronectina é uma glicoproteína multifuncional que contém sítios de ligação a várias moléculas. É também alvo de interação para patógenos e células eucarióticas e pode servir como uma ponte entre a superfície da bactéria e a membrana da célula hospedeira, facilitando a adesão e invasão. No plasma humano, a vitronectina atua como um regulador da via terminal do complemento. Uma vez ligada à superfície bacteriana, a formação do MAC pode ser inibida e o patógeno se protege contra a lise mediada pelo sistema complemento.

Conforme já mencionado, estudos prévios do grupo mostraram que leptospiras são capazes de se ligar à vitronectina (SILVA et al., 2015). Neste trabalho, avaliou-

se o envolvimento de três proteínas de superfície de *Leptospira* na interação com esta molécula. Os dados indicam que as proteínas LcpA, LigA e LigB interagem com vitronectina por suas porções C-terminais. É interessante ressaltar que essas proteínas se ligam a vários reguladores do sistema complemento simultaneamente, incluindo Fator H e C4BP (BARBOSA et al., 2010; CASTIBLANCO-VALENCIA et al., 2012; SILVA et al., 2015). Além de serem proteínas relacionadas à evasão imune, as proteínas Lig (LigA e LigB) agem também como adesinas interagindo com diversos componentes da matriz extracelular (CHOY et al., 2007). Por serem expressas durante a infecção, as proteínas Lig entram na composição de testes diagnósticos (NABITY et al., 2012) e ensaios de desafio em modelo animal indicam que LigA pode ser um bom candidato vacinal, conferindo níveis de proteção de 70 – 100% em hamsters (SILVA et al., 2007). Neste trabalho, mostramos que essas proteínas também são capazes de se ligar a vitronectina, podendo assim regular a via terminal da cascata do complemento.

Estudos anteriores mostraram que os sítios preferenciais para determinadas proteínas de superfície de bactérias, tais como *Neisseria Opc*, *Haemophilus PE*, e *Moraxella UspA-2*, (SINGH et al., 2010) na molécula de vitronectina são os domínios de ligação à heparina, o que nos levou a investigar se esses domínios também estariam envolvidos na interação de LcpA, LigA e LigB com vitronectina. De fato, no experimento realizado em que aumentamos gradativamente a concentração de heparina, esta inibiu a ligação entre as proteínas e vitronectina de forma dose-dependente. Forças iônicas também parecem desempenhar um papel na interação dessas proteínas com vitronectina, pois concentrações elevadas de sal inibem parcialmente a ligação.

Como diversas bactérias que se ligam à vitronectina também são capazes de se ligar a C9, principal proteína do complexo de ataque à membrana (MAC), avaliou-se também se LcpA, LigA e LigB interagiriam com este componente da via terminal. As três proteínas não só se ligaram a C9 como também impediram a formação do poro *in vitro*, resultante da polimerização de 12 -16 monômeros de C9. A capacidade dessas proteínas de inibir a formação do MAC também foi avaliada utilizando os componentes purificados da via terminal do complemento em um ensaio clássico de hemólise. Tanto a proteína LcpA, quanto as proteínas LigA e LigB inibiram significativamente a lise dos eritrócitos de modo dose-dependente. Como essas três

proteínas interagem com diversos reguladores do sistema complemento, avaliou-se também se esses componentes iriam partilhar regiões sobrepostas e competir pela ligação nas proteínas. Os ensaios de competição envolvendo FH, C4BP e vitronectina demonstram claramente que eles interagem simultaneamente com a proteína LcpA através de locais distintos. Em relação às proteínas Lig, os resultados mostram que também não há competição entre FH e vitronectina por sítios de ligação a essas proteínas.

A evasão ao sistema imune inato, principalmente ao sistema complemento, é crucial para o sucesso na colonização e infecção por leptospiros. Cepas não patogênicas diferem das cepas patogênicas por uma maior susceptibilidade ao soro humano normal, o que pode ser atribuído à capacidade de resistir à morte mediada pelo complemento (MERI et al., 2005). As proteínas de *Leptospira* associadas com evasão ao complemento melhor caracterizadas até então são: LenA, LenB, LigA, LigB, e LcpA (BARBOSA et al., 2010; CASTIBLANCO-VALENCIA et al., 2012; CHOY et al., 2007; STEVENSON et al., 2007). Curiosamente, todas elas compartilham uma característica: ligam-se a várias moléculas do hospedeiro. O mesmo acontece para as proteínas de evasão imune CspA, CspZ, PprA, ErpC, e ErpA de *Borrelia*, causadora da doença de Lyme, que se ligam a FH e plasminogênio (BYKOWSKI et al., 2007; HALLSTRÖM et al., 2010, 2013; KRAICZY et al., 2013; SELING et al., 2010).

Tomados em conjunto, nossos resultados mostram que LcpA, LigA e LigB são moléculas de ligação a múltiplos reguladores do sistema complemento. Através da interação com FH e C4BP, estas proteínas de membrana de *Leptospira* podem contribuir para a regulação negativa das vias alternativa, clássica e das lectinas do complemento, e interagindo com vitronectina e C9, podem interferir com a via terminal deste sistema, evitando a deposição de MAC na superfície bacteriana. O controle de múltiplas etapas da cascata do complemento certamente contribui para a colonização bem sucedida do hospedeiro por leptospiros patogênicos. Como já foi mencionado, a vitronectina é uma glicoproteína humana que também faz parte da matriz extracelular, e dados da literatura relatam a interação de *Leptospira* com vários componentes da matriz extracelular. A possibilidade de que a vitronectina multimérica, depositada na matriz, possa ajudar na adesão aos tecidos do hospedeiro é algo a ser estudado.

Uma série de proteínas associadas à evasão ao sistema imune, principalmente ao sistema complemento, tem sido estudada tanto em bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas e até mesmo em fungos. O fato de um microorganismo possuir mais de uma proteína associada à evasão não é incomum. Dados da literatura revelam uma grande quantidade de moléculas de patógenos que mimetizam ou sequestram reguladores diversos do sistema complemento. Analisados em conjunto, esses estudos apontam para três aspectos: diversidade, multiplicidade e redundância (ZIPFEL et al., 2013). A diversidade é revelada pelo fato de não existir um padrão genômico ou estrutura molecular comum a essas proteínas de escape ao sistema complemento. A multiplicidade se traduz no fato de que uma única proteína de escape de um determinado patógeno pode ser capaz de se ligar a diversos reguladores do sistema complemento simultaneamente e como consequência controlar diversas etapas da cascata e reações imunológicas. E por fim, a redundância, em que o patógeno possui a capacidade de expressar ao mesmo tempo várias proteínas de evasão imune para controlar uma mesma ação na cascata.

O presente estudo reproduz esse padrão. As três proteínas de *Leptospira* aqui estudadas são muito diferentes no que diz respeito à massa molecular e aos domínios que apresentam. No entanto, possuem a mesma função no que tange à evasão imune, retratando a diversidade apresentada por estas bactérias. Ainda, são capazes de se ligar a diversos reguladores do sistema complemento (C4BP, FH e vitronectina) controlando múltiplos pontos da cascata, revelando a plasticidade ou multiplicidade deste patógeno. Por fim, proteínas diversas desempenhando a mesma função preenchem o quesito redundância. Todas essas características fazem parte de um mecanismo eficiente dos patógenos para colonizar o hospedeiro.

Em suma, a identificação de proteínas envolvidas no processo de colonização é fundamental para o conhecimento da patogenicidade da bactéria e poderá contribuir para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas e/ou preventivas que interfiram no processo de evasão imune de leptospiros patogênicos.

## 6 CONCLUSÕES

Neste estudo demonstramos pela primeira vez a interação de bactérias do gênero *Leptospira* com um regulador da via terminal do sistema complemento, a vitronectina. Identificamos e caracterizamos também três proteínas de membrana responsáveis por essa ligação, LcpA, LigA e LigB.

Verificamos que essa ligação ocorre através das regiões C-terminais das proteínas com as regiões de domínio de heparina na molécula de vitronectina e que forças iônicas podem desempenhar um papel nessa interação devido ao ensaio com altas concentrações de sal inibindo parcialmente essa ligação.

Também verificamos que além dessas três proteínas interagirem com vitronectina, elas interagem com o componente C9, formador do poro do complexo de ataque à membrana, e que a presença dessas proteínas junto aos componentes do MAC é capaz de inibir a formação desse polímero. Ainda, em um ensaio de hemólise, observamos que as proteínas são capazes de diminuir a lise das hemácias na presença com os componentes formadores do MAC.

Por fim, avaliamos que não há competição entre as proteínas LigA, LigB e LcpA na interação com diversos reguladores do sistema complemento como C4BP, Fator H e vitronectina.

A caracterização funcional dessas proteínas, consideradas bons candidatos vacinais, e a descoberta de novos mecanismos utilizados por esse patógeno para sobreviver no hospedeiro podem auxiliar nossa compreensão no que diz respeito a aspectos relacionados à clínica e à prevenção da leptospirose.

## REFERÊNCIAS\*

- ADLER, B. **Leptospira and Leptospirosis**. 1ª ed. Austrália: Springer, 2015. 295 p.
- AHMED, A. et al. Development and Validation of a Real-Time PCR for Detection of Pathogenic *Leptospira* Species in Clinical Materials. **PLoS ONE**, v. 4, n. 9, p. e7093, 2009.
- ATZINGEN, M. et al. Lsa21, a novel leptospiral protein binding adhesive matrix molecules and present during human infection. **BMC Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 70, 2008.
- BANFI, E. et al. The Role of Antibodies and Serum Complement in the Interaction between Macrophages and Leptospire. **Microbiology**, v. 128, n. 4, p. 813-816, 1982.
- BARBOSA, A. et al. A Newly Identified Leptospiral Adhesin Mediates Attachment to Laminin. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 11, p. 6356-6364, 2006.
- BARBOSA, A. et al. Immune Evasion of *Leptospira* Species by Acquisition of Human Complement Regulator C4BP. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 3, p. 1137-1143, 2008.
- BARBOSA, A. et al. Functional Characterization of LcpA, a Surface-Exposed Protein of *Leptospira spp.* That Binds the Human Complement Regulator C4BP. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 7, p. 3207-3216, 2010.
- BHARTI, A. et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **Lancet Infectious Diseases**, v. 3, n. 12, p. 757-71, 2003.
- BREINER, D. et al. *Leptospira interrogans* Binds to Human Cell Surface Receptors Including Proteoglycans. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 12, p. 5528-5536, 2009.
- BRENNER, D. et al. Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family *Leptospiraceae* with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. nov. and four new *Leptospira genomospecies*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 49, n. 2, p. 839-858, 1999.
- BRIHUEGA, B. et al. *In vivo* Cell Aggregations of a Recent Swine Biofilm-forming Isolate of *Leptospira interrogans* Strain from Argentina. **Revista Argentina de Microbiologia**, v. 44, n. 3, p. 138-143, 2012.
- BYKOWSKI, T. et al. *Borrelia burgdorferi* Complement Regulator-acquiring Surface Proteins (BbCRASPs): Expression patterns during the mammal–tick infection cycle. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 298, p. 249-256, 2008.

\* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS.

**NBR6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.



CASTIBLANCO-VALENCIA, M. et al. Leptospiral Immunoglobulin-like Proteins Interact With Human Complement Regulators Factor H, FHL-1, FHR-1, and C4BP. **Journal of Infectious Diseases**, v. 205, n. 6, p. 995-1004, 2012.

CHASSIN, C. et al. TLR4- and TLR2-Mediated B Cell Responses Control the Clearance of the Bacterial Pathogen, *Leptospira interrogans*. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 4, p. 2669-2677, 2009.

CHOY, H. et al. Physiological Osmotic Induction of *Leptospira interrogans* Adhesion: LigA and LigB Bind Extracellular Matrix Proteins and Fibrinogen. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 5, p. 2441-2450, 2007.

CULLEN, P. et al. Outer Membrane Proteins of Pathogenic Spirochetes. **FEMS Microbiology Reviews**, vol. 28, n. 3, p. 291-318, 2004.

De Paula, P. et al. Ontogeny of Complement Regulatory Proteins - concentrations of factor H, factor I, C4b Binding Protein, properdin and vitronectin in healthy children of different ages and in adults. **Scandinavian Journal of Immunology.**, v. 58, n. 5, p. 572-577, 2003.

DOMINGOS, R. et al. Novel *Leptospira interrogans* protein Lsa32 is expressed during infection and binds laminin and plasminogen. **Microbiology**, v. 161, n. 4, p. 851-864, 2015.

FAINE, S. et al. **Leptospira and Leptospirosis**. 2<sup>a</sup> ed. Austrália: MediSci, 1999. 272 p.

FRAGA, T. et al. Immune Evasion by Pathogenic *Leptospira* Strains: The Secretion of Proteases that Directly Cleave Complement Proteins. **Journal of Infectious Diseases**, v. 209, n. 6, p. 876-886, 2013.

HALLSTRÖM, T.; RIESBECK, K. *Haemophilus Influenzae* and the Complement System. **Trends in Microbiology**, v. 18, n. 6, p. 258-265, 2010.

HALLSTRÖM, T. et al. CspA from *Borrelia burgdorferi* Inhibits the Terminal Complement Pathway. **mBio**, v. 4, n. 4, p. e00481-13-e00481-13, 2013.

HAUK, P. et al. In LipL32, the Major Leptospiral Lipoprotein, the C Terminus Is the Primary Immunogenic Domain and Mediates Interaction with Collagen IV and Plasma Fibronectin. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 6, p. 2642-2650, 2008.

HAYMAN, E. et al. Serum Spreading Factor (Vitronectin) is Present at the Cell Surface and in Tissues. **Proceedings National Academy Science U.S.A.**, v. 80, n. 13, p. 4003-4007, 1983.

KITAOKA, M.; INOUE, S. Standard Procedures of Weil's Disease Vaccine and Weil's Disease and Akiyami Combined Vaccine. **Japanese Medical Journal**, v. 1478, p. 2845-2847, 1952.

KOIZUMI, N.; WATANABE, H. Leptospiral immunoglobulin-like proteins elicit protective immunity. **Vaccine**, v. 22, n. 11-12, p. 1545-52, 2004.

KOIZUMI, N.; WATANABE, H. Leptospirosis vaccines: past, present and future. **Journal Postgrad Medicine**, v. 51, n. 3, p. 210-214, 2005.

KO, A.; GOARANT, C.; PICARDEAU, M. Leptospira: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 10, p. 736-747, 2009.

KÖHL, J. Self, Non-Self, and Danger: A Complementary View. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, p. 71-94, 2006.

KRAICZY, P.WÜRZNER, R. Complement escape of human pathogenic bacteria by acquisition of complement regulators. **Molecular Immunology**, v. 43, n. 1-2, p. 31-44, 2006.

LEE, S. et al. Identification and partial characterization of a Novel Hemolysin from *Leptospira Interrogans* serovar lai. **Gene**, v. 254, n. 1-2, p. 19-28, 2000.

LEVETT, P. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 2, p. 296-326, 2001.

LIN, Y.; CHANG, Y. A domain of the *Leptospira* LigB contributes to high affinity binding of fibronectin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 362, n. 2, p. 443-448, 2007.

LIN, Y.; CHANG, Y. The C-terminal variable domain of LigB from *Leptospira* Mediates Binding to Fibronectin. **Journal of Veterinary Science**, v. 9, n. 2, p. 133-144, 2008.

LIN, Y. et al. Repeated Domains of *Leptospira* Immunoglobulin-like Proteins Interact with Elastin and Tropoelastin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 29, p. 19380-19391, 2009.

LIN, Y. et al. The Terminal Immunoglobulin-Like Repeats of LigA and LigB of *Leptospira* Enhance Their Binding to Gelatin Binding Domain of Fibronectin and Host Cells. **PLoS ONE**, v. 5, n. 6, p. e11301, 2010.

LIN, Y. et al. *Leptospira* immunoglobulin-like protein B (LigB) binding to the C-terminal fibrinogen  $\alpha$ C domain inhibits fibrin clot formation, platelet adhesion and aggregation. **Molecular Microbiology**, v. 79, n. 4, p. 1063-1076, 2011.

MARTÍNEZ, R. et al. Efficacy and safety of a vaccine against human leptospirosis in Cuba. **Revista Panama Salud Publica**, v. 15, n. 4, p. 249-255, 2004.

MATSUNAGA, J. et al. Osmolarity, a Key Environmental Signal Controlling Expression of Leptospiral Proteins LigA and LigB and the Extracellular Release of LigA. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 1, p. 70-78, 2004.

MCBRIDE, A. et al. Leptospirosis. **Current Opinion Infection Diseases**, v. 18, n. 5, p. 376-386, 2005.

MERI, T. et al. Regulation of complement activation at the C3-level by serum resistant leptospires. **Microbial Pathogenesis**, v. 39, n. 4, p. 139-147, 2005.

MERIEN, F.; BARANTON, G.; PEROLAT, P. Invasion of Vero cells and Induction of Apoptosis in Macrophages by Pathogenic *Leptospira interrogans* are Correlated with Virulence. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 2, p. 729-738, 1997.

MILLER, S.; ERNST, R.; BADER, M. LPS, TLR4 and infectious disease diversity. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 36-46, 2005.

MORGAN, B.; HARRIS, C. **Complement Regulatory Proteins**. 1<sup>a</sup> ed. San Diego: Academic Press, 1999. 382 p.

MORGAN, B. et al. Complement central to innate immunity and bridging to adaptive responses. **Immunological Letters** v. 97, p. 171-179, 2005.

NABITY, S. et al. Accuracy of a Dual Path Platform (DPP) Assay for the Rapid Point-of-Care Diagnosis of human Leptospirosis. **Plos Neglected Tropical Diseases**. v. 6, p. e1878, 2012.

NAHORI, M. et al. Differential TLR Recognition of Leptospiral Lipid A and Lipopolysaccharide in Murine and Human Cells. **Journal of Immunology**, v. 175, n. 9, p. 6022-6031, 2005.

OLIVEIRA, R. et al. Intermediate and C-terminal regions of leptospiral adhesin Lsa66 are responsible for binding with plasminogen and extracellular matrix components. **Journal of Medical Microbiology**, v. 63, n. Pt\_9, p. 1119-1130, 2014.

PALANIAPPAN, R. et al. Cloning and molecular characterization of an immunogenic LigA protein of *Leptospira interrogans*. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 11, p. 5924-5930, 2002.

PICARDEAU, M. Leptospirosis: Updating the Global Picture of an Emerging Neglected Disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 9, p. e0004039, 2015.

RAMOS, C. et al. A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. **Brazilian Journal of Medical Biological Research**, v. 37, n. 8, 2004.

RISTOW, P. et al. Biofilm formation by saprophytic and pathogenic leptospires. **Microbiology**, v. 154, n. 5, p. 1309-1317, 2008.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. 2<sup>a</sup> ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 3 vs.

SCHNEIDER, M. et al. Interactions between *Neisseria meningitidis* and the complement system. **Trends Microbiology**, v. 15, p. 233-240, 2007.

SCHROEDER, H. et al. Subversion of complement by hematophagous parasites. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 33, n. 1, p. 5-13, 2009.

SELING, A. et al. Functional Characterization of *Borrelia spielmanii* Outer Surface Proteins That Interact with Distinct Members of the Human Factor H Protein Family and with Plasminogen. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 1, p. 39-48, 2009.

SILVA, E. et al. The terminal portion of leptospiral immunoglobulin-like protein LigA confers protective immunity against lethal infection in the hamster model of leptospirosis. **Vaccine**, v. 25, n. 33, p. 6277-6286, 2007.

SILVA, L. et al. Pathogenic *Leptospira* Species Acquire Factor H and Vitronectin via the Surface Protein LcpA. **Infection and Immunity**, v. 83, n. 3, p. 888-897, 2014.

SINGH, B.; SU, Y.; RIESBECK, K. Vitronectin in bacterial pathogenesis: a host protein used in complement escape and cellular invasion. **Molecular Microbiology**, v. 78, n. 3, p. 545-560, 2010.

SMYTHE, L. et al. Classification of *Leptospira* genomospecies 1, 3, 4 and 5 as *Leptospira alstonii* sp. nov., *Leptospira vanthieli* sp. nov., *Leptospira terpstrae* sp. nov. and *Leptospira yanagawae* sp. nov., respectively. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, n. Pt 5, p. 1859-1862, 2012.

SOUZA, N. et al. Lsa30, a novel adhesin of *Leptospira interrogans* binds human plasminogen and the complement regulator C4bp. **Microbial Pathogenesis**, v. 53, n. 3-4, p. 125-134, 2012.

STEVENSON, B. et al. *Leptospira interrogans* Endostatin-Like Outer Membrane Proteins Bind Host Fibronectin, Laminin and Regulators of Complement. **PLoS ONE**, v. 2, n. 11, p. e1188, 2007.

STOCKMANN, A. et al. Multimeric Vitronectin. Identification and characterization of conformation-dependent self-association of the adhesive protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 30, p. 22874-22882, 1993.

TANG, Y. et al. **Molecular Medical Microbiology**. 2<sup>a</sup> ed. 2015. [In press]

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. **International Leptospirosis Society**. 2003.

VERMA, A. et al. LfhA, a Novel Factor H-Binding Protein of *Leptospira interrogans*. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 5, p. 2659-2666, 2006.

WALPORT, M. Complement. First of two parts. **New England Journal of Medicine**, v. 344, n. 14, p. 1058-1066, 2001.

WANDERSMAN, C.; STOJILJKOVIC, I. Bacterial Heme Sources: the role of heme, hemeprotein receptors and hemophores. **Current Opinion Microbiology**, v. 3, n. 2, p. 215-20, 2000.

WANG, B. Role of Specific Antibody in Interaction of Leptospire with Human Monocytes and Monocyte-derived. **Infection and Immunity**, v. 46, n. 3, p. 809-813, 1984.

WERTS, C. et al. Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. **Nature Immunology**, v. 2, n. 4, p. 346-352, 2001.

YAN, Y. et al. An Evaluation of the Serological and Epidemiological Effects of the Outer Envelope Vaccine to Leptospira. **Journal Chinese of Medical Association**, v. 66, n. 4, p. 224-230, 2003.

ZIPFEL, P. et al. Human Complement Control and Complement Evasion by Pathogenic Microbes – Tipping the balance. **Molecular Immunology**, v. 56, n. 3, p. 152-160, 2013.